

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Aplicación del sistema de recombinación específica de secuencia β -six
al estudio de la regulación de la expresión génica en células eucariotas
y modelos animales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pilar Servert del Río

Directores

**Antonio Bernad Miana
Juan Carlos Alonso Navarro**

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II
Departamento de Parasitología

**APLICACIÓN DEL SISTEMA DE RECOMBINACIÓN
ESPECÍFICA DE SECUENCIA β /SIX AL ESTUDIO DE LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS
EUCARIOTAS Y MODELOS ANIMALES**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por:
Pilar Servert del Río**

Directores:

Antonio Bernad Miana

Profesor de Investigación del CSIC
Departamento de Inmunología y Oncología
Centro Nacional de Biotecnología


Juan Carlos Alonso Navarro

Profesor de Investigación del CSIC
Departamento de Biotecnología Microbiana
Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2015

Los Doctores Antonio Bernad Miana (Profesor Investigador del CSIC, DIO, CNB) y Juan Carlos Alonso Navarro (Profesor Investigador del CSIC, Departamento de Biotecnología Microbiana, CNB), certifican que el trabajo experimental descrito en esta memoria de Tesis Doctoral fue realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología (DIO) del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo su dirección.

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, 2015



Fdo. Dr. Antonio Bernad Miana



Dr. Juan Carlos Alonso Navarro

Este trabajo se ha englobado en varios proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Plan Nacional de I+D+I (GEN2001-4856-C13-02; SAF2001-2262), así como en el Acuerdo de Colaboración para la Investigación Científica entre CSIC y Pharmacia, S.A. para la constitución del Departamento de Inmunología y Oncología (DIO) del CNB (1995-2002).

Ha sido un largo trabajo, un largo camino hasta poder ver esta memoria terminada.
Ha sido largo y duro, pero también interesante y bonito.
Ha pasado mucha gente por mi vida que me ha ayudado a llegar a este momento,
mucha gente que ha colaborado de un modo u otro, que me ha animado a empezar y
también a terminar este proyecto.

Empiezo sin dudar por Antonio Bernad, que día a día me guió y me dio su apoyo, y sigue dándomelo, eso es un Jefe, muchas gracias por todos esos años de vida científica en tu labo. Juan Carlos, tú fuiste el primero en creer en mí, me abriste la puerta de la ciencia, y sigues ahí al final, muchas gracias.

El 412, con todos sus componentes, irrepetible e irremplazable, fuísteis los mejores compañeros y amigos que se pueden tener. Tanto en los aspectos científicos como en los personales, siempre os tuve cerca y conseguíais que las largas jornadas fuesen días estupendos, aunque a veces no saliese nada y tuviésemos que empezar de nuevo....

Ligos, Dani, Isa, Gel, Carmele, Ross, Javi, Manuel, Jose Luis, Vic, y todos los que pasásteis parte de vuestra vida allí... ¡Gracias por todo, cada uno aportásteis un trocito vuestro para ir haciendo camino!

Chusi, Babs, Mtxu, que decir de vosotras, es un orgullo el poder considerarme amiga vuestra. Hace mucho tiempo que dejamos atrás esta etapa, y sin embargo, para mí, podría ser ayer, o podría ser mañana, siempre estaréis conmigo.

Al resto del microecosistema del DIO, muchas gracias a todos, un departamento genial, Cathy, Coral, Antonio Rodríguez Terán, otros jefes y becarios, a Luis Mi, bienhechor de mis ratoncitos, todos me ayudábais en lo que podíais con vuestra mejor sonrisa.

El recuerdo de mis años de predoc me sacará una sonrisa toda la vida, ¡gracias!

Fuera de la ciencia mi entorno no se quedó corto....hermanitos, sois los mejores hermanos que puedo tener; amigos, todos me apoyasteis siempre, a pesar de que mis horarios de trabajo y mis razonamientos en voz alta fuesen a veces una locura para vosotros.
Sandra, siempre ahí, mi mejor y gran amiga, no siempre era fácil aguantarme, ¡espero tenerte siempre!

Papá, mamá, sois los mejores padres del mundo, ¡me habeis dado la vida y me habeis enseñado tantas y tantas cosas! Cómo se hacen las cosas, sentimientos, conocimientos, principios, siempre apoyándome y animándome en todo, seguros de que yo podría hacer todo lo que me propusiese, no os cansabais de decírmelo, siempre habéis creído en mí. No os podéis imaginar lo importantes que sois para mí. Intento hacerlo igual.

Fer, mi amor, mi vida, TE QUIERO. Nos conocimos empezando yo la tesis y hoy seguimos de la mano, mirando en la misma dirección, siempre. ¡Cuántos sueños nos quedan aún por soñar! Ahora a seguir viviendo, juntos, a por todas.
Gracias por todo, todo y todo, ¡sin ti, ya lo sabes, esto no sería posible!

“ EL ÉXITO NO ES LA VICTORIA, SINO TODO LO QUE HAS PELEADO POR GANAR”

Rafa Nadal

Para Musmus y para Lili

Creed en vosotros mismos.
Conseguireis todo lo que os propongais.
¡Os quiero, pitufos!

ÍNDICE

ABREVIATURAS
SUMMARY
RESUMEN
INTRODUCCIÓN

1. LA MANIPULACIÓN DEL GENOMA
 - 1.1. El ratón como modelo experimental
 - 1.2. Manipulación génica germinal
 - 1.2.1. Electroporación en células ES y *gene targeting*
 - 1.2.2. Microinyección en pronúcleos de la célula germinal fertilizada (cigoto)
 - 1.3. Limitaciones de la transgénesis y *gene targeting* convencionales: necesidad de herramientas condicionales
2. RECOMBINASAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA (REC)
 - 2.1. Familia de las tirosina recombinasas: Cre y FLP
 - 2.2. Familia de las serina recombinasas: ϕ C31, Tn3, $\gamma\delta$, β
 - 2.3. Aplicaciones de las recombinasas específicas de secuencia en modelos murinos: Diseño básico de los experimentos y modelos condicionales
 - 2.3.1. Modelos condicionales tisulares
 - 2.3.1.1. Generación de ratones transgénicos a la recombinasa
 - 2.3.1.2. Generación de ratones *Knockin* condicionales
 - 2.3.1.3. Generación de ratones *Knockout* condicionales
 - 2.3.2. Modelos condicionales: Expresión y/o actividad inducibles
 - 2.3.2.1. Control de la expresión de la recombinasa
 - 2.3.2.2. Control de la actividad de la recombinasa
 - 2.3.3. Modelos condicionales alternativos: otras vías de administración de las recombinasas
 - 2.3.4. Uso combinado de dos recombinasas
 - 2.3.5. Cre y FLP: estudio comparativo y mejoras realizadas
 - 2.3.6. La especificidad de secuencia diana y los modelos de recombinación específica de secuencia (RES). *Gene editing*
3. LA β RECOMBINASA (β -rec)
 - 3.1. Origen y características generales
 - 3.2. Caracterización del sistema: estudios en procariotas
 - 3.2.1. Requerimientos de la reacción: presencia de un cofactor y estado del ADN
 - 3.2.2. Eficacia de la reacción: sistemas de activación génica mediada por recombinación (RAGE)
 - 3.2.3. Utilización conjunta de dos recombinasas: β recombinasa e int
 - 3.3. Estudios previos en el entorno eucariota
 - 3.3.1. Localización subcelular
 - 3.3.2. Cofactores de la reacción
 - 3.3.3. Estado del ADN: eficacia de la reacción en sustratos episomales e integrados en la cromatina
 - 3.3.4. β /six en sistemas de activación génica mediada por recombinación (RAGE)
 - 3.3.5. Modelos murinos de aplicación
4. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS
 - 4.1. El receptor de andrógeno (AR)
 - 4.1.1. Localización subcelular y traslocación
 - 4.1.2. Estabilidad del receptor
 - 4.1.3. Aplicación del dominio de unión a ligando (LBD) del AR a modelos inducibles murinos de recombinación específica de secuencia

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES
 - 1.1. Células
 - 1.1.1. Cepas bacterianas
 - 1.1.2. Líneas celulares y cultivo
 - 1.2. Líneas de ratones
 - 1.3. Anticuerpos
 - 1.4. Oligonucleótidos
 - 1.5. Plásmidos y vectores
 - 1.6. Enzimas de restricción
 - 1.7. Productos químicos generales
2. MÉTODOS
 - 2.1. Clonajes
 - 2.1.1. Transformaciones en bacterias
 - 2.2. Transfecciones
 - 2.3. Extracción de ADN genómico
 - 2.4. Tratamiento hormonal
 - 2.5. Detección de actividad β recombinasa *in vitro*
 - 2.6. Detección de productos de recombinación específica de secuencia por PCR
 - 2.6.1. PCR semicuantitativa
 - 2.7. Detección de productos de recombinación homóloga y específica de secuencia por *Southern Blot*
 - 2.8. Ensayo de detección de actividad luciferasa
 - 2.9. Ensayo de detección de actividad β -galactosidasa *in situ*
 - 2.10. Producción de sobrenadantes retrovirales y transducción
 - 2.11. Inmunodetección de proteínas fijadas a membrana (*Western Blot*)
 - 2.11.1. Extracción de proteínas totales
 - 2.11.2. Separación de proteínas y transferencia a filtro
 - 2.11.3. Inmunodetección
 - 2.11.4. Deshibridación y reutilización de membranas (*stripping*)
 - 2.12. Optimización del antisuero policlonal contra la β recombinasa
 - 2.13. Citometría de flujo y FACS
 - 2.14. Tinción hematoxilina-eosina de órganos parafinados
 - 2.14.1. Inclusión de órganos
 - 2.14.2. Tinción hematoxilina-eosina
 - 2.15. Inmunofluorescencia en células NIH-3T3 y linfocitos T
 - 2.15.1. Preparación de células NIH-3T3
 - 2.15.2. Preparación de linfocitos T
 - 2.15.3. Inmunofluorescencia
 - 2.16. Extracción de células linfoides murinas y enriquecimiento
 - 2.16.1. Extracción de órganos
 - 2.16.2. Enriquecimiento en linfocitos B
 - 2.16.3. Enriquecimiento en linfocitos T totales
 - 2.16.4. Purificación de las distintas poblaciones de linfocitos T
 - 2.16.5. Obtención de linfocitos T activados

RESULTADOS

PARTE I: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN LÍNEAS CELULARES

1. DESARROLLO DE VECTORES RETROVIRALES
 - 1.1. Vectores de expresión de la actividad β recombinasa
 - 1.1.1. Proceso de clonaje y análisis proteico de la Egfp y la β recombinasa
 - 1.1.2. Análisis de la actividad recombinasa

- 1.2. Vectores que incluyen sustratos de recombinación
 - 1.2.1. Estrategia I: Construcción de los vectores y análisis citométrico de la expresión del transgen
 - 1.2.2. Estrategia II: Construcción de los vectores y análisis citométrico de la expresión del transgen
2. ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN MEFs DEFICIENTES EN HMG1
3. MODELO DE ACTIVACIÓN GÉNICA MEDIADA POR RECOMBINACIÓN (RAGE)
 - 3.1. Construcciones utilizadas: Proceso de clonaje y ensayo de recombinación *in vitro* (RIV)
 - 3.2. Estudio de la localización celular de las proteínas β -Egfp y β -IRES-Egfp
 - 3.3. Análisis de la recombinación en células NIH-3T3: Generación de estables a la construcción respondedora y análisis de la recombinación
 - 3.4. Análisis de la recombinación en clones estables al sustrato
 - 3.5. Estudio de la recombinación incompleta del sustrato. Tres posibles razones: Inaccesibilidad del sustrato, insuficiente cantidad de recombinasa y reversibilidad del sistema
 - 3.5.1. Análisis molecular de la recombinación
 - 3.5.2. Estudio proteico
 - 3.5.3. Estudio de la recombinación por análisis de la expresión del gen marcador
4. MODELO INDUCIBLE DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA
 - 4.1. Desarrollo de las construcciones utilizadas
 - 4.2. Estudio de la actividad: medidas de la recombinación por análisis del gen marcador
 - 4.2.1. Recombinación en el sistema de la doble proteína de fusión (β -LBD-IRES-Egfp)
 - 4.2.2. Recombinación en el sistema de la triple proteína de fusión (β -Egfp-LBD)
 - 4.3. Evaluación de la inducibilidad mediante el estudio de la expresión y traslocación proteica
 - 4.3.1. Localización de la doble proteína de fusión (β -LBD-IRES-Egfp)
 - 4.3.2. Localización de la triple proteína de fusión (β -Egfp-LBD)
 - 4.4. Estudio de la expresión por *Western Blot*

PARTE II: MODELOS IN VIVO

5. MODELO DE TRANSGÉNESIS AL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN
 - 5.1. Construcción del vector sustrato y verificación de la capacidad de recombinación por recombinación *in vitro* y por análisis del gen marcador
 - 5.2. Microinyección, obtención y establecimiento de líneas murinas portadoras del transgen
 - 5.3. Análisis fenotípico y estudio citométrico de las poblaciones linfocitarias
 - 5.4. Infección con la β recombinasa de linfocitos T primarios: Análisis de la expresión proteica y estudio de la recombinación
 - 5.5. Análisis de la recombinación en ratones doble transgénicos al sustrato y a la β recombinasa
 - 5.5.1. Análisis de la recombinación en timo, órganos linfoides secundarios y poblaciones linfocitarias parcialmente purificadas
 - 5.5.1.1. Estudio en órganos totales
 - 5.5.1.2. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos B
 - 5.5.1.3. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos T totales
 - 5.5.2. Análisis de la recombinación en poblaciones de linfocitos T altamente purificadas
 - 5.5.2.1. Estudio de la recombinación por PCR
 - 5.5.2.2. Estudio de la recombinación por *Southern Blot*
 - 5.5.2.3. Estudio de la recombinación por expresión del gen marcador

6. MODELO DE KNOCKOUT CONDICIONAL
 - 6.1. Construcción del vector de *targeting*: clonaje y verificación (RIV)
 - 6.2. Obtención y análisis de clones de ES portadores del sustrato
 - 6.3. Estudio de la recombinación específica de secuencia en células ES
 - 6.3.1. Comparativa de la eficacia de transfección en ES de diferentes promotores y esqueletos
 - 6.3.2. Transfección de la β recombinasa en clones positivos al sustrato y análisis de la recombinación
 - 6.4. Agregación y obtención de líneas murinas respondedoras
 - 6.5. Análisis fenotípico
 - 6.5.1. Datos generales de la maduración de los linfocitos T
 - 6.5.2. Análisis histológico del timo
 - 6.5.3. Estudio citométrico de las poblaciones linfocitarias
 - 6.6. Infección con la β recombinasa de linfocitos T primarios: Análisis de la expresión proteica y estudio de la recombinación
 - 6.7. Análisis de la recombinación en ratones *Knockout* al sustrato y transgénicos a la β recombinasa
 - 6.7.1. Análisis de la recombinación en timo, órganos linfoides secundarios y poblaciones linfocitarias parcialmente purificadas
 - 6.7.1.1. Estudio en órganos totales
 - 6.7.1.2. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos B
 - 6.7.1.3. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos T totales
 - 6.7.2. Análisis por PCR de la recombinación en poblaciones de linfocitos T altamente purificadas

DISCUSIÓN

PARTE I: MODELOS DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN LÍNEAS CELULARES

1. DESARROLLO DE VECTORES RETROVIRALES DE EXPRESIÓN DE LA β RECOMBINASA Y DEL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN
 - 1.1. Vectores de expresión de la β recombinasa
 - 1.2. Vectores que portan el sustrato de recombinación
2. PAPEL DEL COFACTOR DE REACCIÓN HMG1
3. MODELO DE ACTIVACIÓN GÉNICA MEDIADA POR RECOMBINACIÓN
4. ANÁLISIS DE LA IRREVERSIBILIDAD DE LA REACCIÓN DE RESOLUCIÓN
5. DESARROLLO Y UTILIDAD DE MODELOS INDUCIBLES DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA

PARTE II: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS MURINOS CONDICIONALES

6. MODELO DE TRANSGÉNESIS AL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN (Tgrec)
7. MODELO DE KNOCKOUT CONDICIONAL DEL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN (KOsix)

EL SISTEMA β /six: REALIDADES Y RETOS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Receptor de andrógeno
ARN	Ácido ribonucleico
d	Día/s
DBD	Dominio de unión a ADN (<i>DNA Binding Domain</i>)
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
Egfp	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Receptor de estrógeno
ES	Células madre embrionarias (<i>Embryonic Stem</i>)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
gfp	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Hora/s
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
ht	heterocigoto
IF	Inmunofluorescencia
Kb	Kilobase/s
kDa	Kilodalton/s
KO	Deficiencia o pérdida de un gen (<i>Knockout</i>)
LBD	Dominio de unión a ligando (<i>Ligand Binding Domain</i>)
pLck	Promotor proximal del gen Lck
Luc	Luciferasa
mib	Mibolerona
min	Minuto/s
NTD	Dominio amino terminal
μ	Micro
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
NR	No recombinado de forma específica de secuencia
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
R	Recombinado de forma específica de secuencia
RAGE	Expresión génica mediada por recombinación (<i>Recombination Activated Gene Expression</i>)
RIV	Recombinación <i>in vitro</i>
RLUs	Unidades relativas de luz (<i>Relative Light Units</i>)
RMCE	Intercambio de casete mediado por recombinación (<i>Recombinase Mediated Cassette Exchange</i>)
seg	Segundo/s
six	Secuencia de reconocimiento de la β recombinasa
SPRD	<i>Spectral Red</i>
Rec	Recombinasa específica de secuencia
RES	Recombinación específica de secuencia
SB	<i>Southern Blot</i>
SSR	<i>Site Specific Recombination</i>
TCR	Receptor de células T (<i>T Cell Receptor</i>)
Tg	Transgen, organismo transgénico
v.t	Vector de <i>targeting</i>
WB	<i>Western Blot</i>
wt	Silvestre, no modificado (<i>wild type</i>)

NOTA: algunas siglas se han mantenido en inglés debido a la ausencia de un equivalente estandarizado en español o porque su uso está ampliamente extendido dentro de la comunidad científica.

SUMMARY

There are two families of conservative site-specific recombination (SSR) systems (tyrosine and serine recombinases). The tyrosine recombinases (e.g., Cre and Flp) use an invariant active-site tyrosine residue to attack the DNA phosphodiester in the DNA-cleavage step of the recombination reaction, whereas the serine recombinases (e.g., Res, β -rec, Hin) use an invariant serine residue. Tyrosine recombinases catalyse site-specific integration and excision, whereas serine recombinases catalyse excision or inversion.

SSR is a powerful tool for conditional genomic modifications. It allows programmed recombination in a tissue/lineage-specific and/or inducible manner that overcome some limitations of classical knockout systems, such as embryonic lethality or generation of compensation mechanisms.

Cre/loxP and Flp/FRT are currently the most established systems, in both animal models and in plants. Due to the need of more complex modifications, it is necessary to characterize other site-specific recombination systems that could be used as an alternative to or in combination with existing models.

β recombinase (β -rec) is a site specific recombinase from the Gram-positive plasmid pSM19035, that requires a supercoiled substrate and a chromatin-associated protein (e.g., bacterial Hbsu or eukaryotic HMG1). The β -rec induces specific intramolecular recombination in mammalian cells, in both episomal plasmids and chromatin-associated substrate structures, implying that the mammalian cell environment can provide such a host factor, and that global nuclear genomic DNA supercoiling is sufficient for β -rec function. In this work we demonstrated that β -rec-mediated recombination is efficiently performed in an HMG1 knockout cell line. This and previous data clearly suggests that in eukaryotic environments there are other chromatin-associated proteins that could act as helpers in β -mediated reactions, and therefore it is expected that those reactions could occur in most cell types and tissues.

In order to obtain additional insights regarding β -rec system application for the manipulation of eukaryotic genomes, we developed a RAGE (Recombination-Activated Gene Expression) system dependent on β -rec activity; it has been demonstrated functional both in transient transfection and on stable integrated substrates. We have also generated a retroviral vector that includes a β -rec fusion to Egfp (β -Egfp). This is a fast, simple and highly efficient way to transduce cell lines with β -Egfp protein, which maintains its almost exclusive nuclear localization and full activity.

To determine whether the genome integration site environment affect the effectiveness of the SSR reaction, we obtained stable RAGE substrate clones and transduced them with the β -Egfp retroviral vector. After FACS purification of the Egfp⁺ population, SSR was analyzed by PCR and reporter gene activity measurement. Most clones showed substantial recombination of the substrate structure. To address whether the lack of recombination was due to chromatin inaccessibility, insufficient recombinase expression, or a reversible recombination process (absent in *in vitro* experiments), we analyzed the recombination rates of several β -Egfp-transduced subclones. Some appeared totally recombined from the starting point, whereas for others, recombination rates improved with time. These differences appeared to be related to β -rec levels, as Western Blot and reporter analysis showed reduced expression in the less efficient clones.

An inducible SSR system using the β /six model and the androgen receptor (AR) LBD (LBD-AR) was developed. The AR is located primarily in cytoplasm; after binding to an AR agonist it translocates to the nucleus and binds specific DNA regions, activating transcription of its target genes. We have generated two chimeric fusion molecules (a double fusion β -LBD and a triple fusion β -Egfp-LBD), and evaluated their protein expression level, subcellular localization and potential to induce SSR upon addition of the androgen analogue mibolerone. Results indicate that in both fusion proteins β -rec activity could be controlled by addition of mibolerone. In general terms, the double fusion protein demonstrate a more canonical expected behaviour.

To evaluate the β /six potential in the murine models environment we developed two substrate mouse strains: 1. a transgenic strain harbouring the RAGE (six-pur^R-six-LacZ) reporter

cassette (Tgrec) and 2. a knockout strain harbouring the substrate (six-neo^R-six) cassette precisely located in the TCR β enhancer region (KOsix).

A transgenic mouse strain expressing β -rec under the control of the T-cell proximal Lck promoter (Tg β) was generated. Specific expression of β -rec was confirmed, with no related alterations. Double heterozygotes were generated for evaluation of the activity of the β -rec protein on the specific target sequence (Tgrec/Tg β and KOsix/Tg β).

Tgrec strain was obtained by microinjection, and demonstrated to be accessible and recombined by β -Egfp protein (by transduction of peripheral blood cells with the previously described retroviral vector).

Double heterozygote mice harbouring the reporter cassette and the Tg β constructs (Tgrec/Tg β) were obtained after crossing the above indicated mouse lines, and expression of β -rec was confirmed. The presence of the diagnostic β -dependent SSR band was analyzed by SQ-PCR in several organs and cell subpopulations. The results obtained clearly suggest that β -rec activity is detectable in thymus, spleen and ganglia, but not in the control organs. In the context of particular lymphoid subpopulations, single positive (SP) thymic, splenic and ganglionic populations seem to be the major place for the β -rec-dependent SSR. The activity demonstrated in SP peripheral T cells is quite high, being difficult to detect the non-recombined allele.

KOsix strain was generated using a SSR scheme as previously described for Cre/loxP system. After demonstrating the capacity to act as substrate *in vitro*, the modified ES cells were generated and also evaluated as substrate for ectopic expressed β -rec protein; ES derived mouse strains were evaluated by transduction of peripheral blood T cells with the previously described retroviral vector, and they clearly showed the expected SSR band.

Double heterozygote mice harbouring the KOsix reporter cassette and the Tg β constructs (KOsix/Tg β) were obtained and β -rec expression was confirmed. The analysis by PCR showed the presence of the β -rec-dependent SSR band specifically in thymus, spleen and ganglia. After FACS purification of the lymphoid subpopulations, single positive (SP) thymic, splenic and ganglionic T lymphocytes had undergone an almost completely SSR, in agreement with the theoretical expression pattern ligated to the Lck promoter.

The results presented in this work highly support usefulness of the β /six system as a tool for conditional modification of eukaryotic genomes, used independently or in combination with other SSR systems.

RESUMEN

Las recombinasas específicas de secuencia son herramientas muy valiosas en la generación de modificaciones génicas condicionales. Estos sistemas permiten controlar la recombinación de forma específica de tejido, temporalmente, o ambas, y sortean diversas limitaciones de los sistemas de *knockout* (KO) convencionales, como la letalidad embrionaria o la generación de mecanismos compensatorios.

Actualmente los sistemas Cre/loxP y Flp/FRT son los más empleados tanto en modelos animales como vegetales. La necesidad de realizar modificaciones más complejas en un mismo organismo hace que sea primordial caracterizar otras recombinasas que complementen a las existentes.

La β recombinasa (β -rec) es originaria del plásmido pSM19035 de *Streptococcus pyogenes*. A diferencia de Cre y Flp, que en ausencia de factores adicionales catalizan la integración en un nuevo sustrato, la β -rec necesita un sustrato superenrollado y un cofactor de la reacción, una proteína asociada a la cromatina (como la procariota Hbsu o la eucariota HMG1). Se ha demostrado que la β -rec cataliza de forma específicamente intramolecular (resolución o inversión) la recombinación en células eucariotas, tanto de sustratos episomales como integrados en la cromatina, lo que indica que el entorno eucariota es capaz de proveer del cofactor y del superenrollamiento necesarios para que la β -rec realice su función.

En este trabajo hemos determinado que la tasa de recombinación mediada por la β -rec no se ve afectada en absoluto por la deficiencia en el cofactor HMG1, alcanzando el mismo valor de recombinación en MEF KO en HMG1 que en wt. Este y otros datos confirman que en el entorno eucariota hay otras proteínas accesorias que pueden actuar de cofactores y sugiere que estas reacciones pueden ocurrir en la mayor parte de tejidos y tipos celulares.

Para estudiar detalladamente el potencial de la β -rec en eucariotas desarrollamos un sistema de RAGE (activación génica mediada por recombinación) dependiente de la actividad β -rec; este sistema ha resultado funcional tanto en sustratos episomales como en sustratos integrados en la cromatina. También hemos generado un vector retroviral que porta la proteína de fusión β -Egfp, permitiendo de forma rápida y eficiente la integración y expresión funcional de nuestra proteína.

Para determinar el efecto del lugar de integración del sustrato en la eficacia de la recombinación, hemos obtenido clones estables al sustrato de RAGE y en ellos hemos introducido la β -Egfp por transducción retroviral. Tras la purificación por FACS de la población Egfp⁺ analizamos la recombinación por PCR y por actividad del gen marcador. La mayoría de los clones mostró una alta recombinación, pero no fue así en todos los casos. Para determinar si la falta de recombinación era debida a inaccesibilidad del sustrato, a una insuficiente expresión de la enzima o bien a un proceso reversible de recombinación (el cual no se produce en los experimentos *in vitro*), analizamos la tasa de recombinación de varios subclones, donde teniendo un mismo sustrato poseían diferente dosis de β -rec. Los resultados apuntan a una dependencia del nivel de expresión de la β -rec, pues los niveles proteicos se correlacionaron perfectamente con los niveles de recombinación y los de expresión del marcador.

Generamos en paralelo un sistema inducible de recombinación específica de secuencia usando el sistema β /six y el dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de andrógeno (AR-LBD). El AR se encuentra normalmente en el citoplasma y, en presencia de su ligando, trasloca al núcleo y se une a secuencias específicas del ADN, activando la transcripción de sus genes diana. Hemos generado dos proteínas de fusión, una doble β -LBD y otra triple β -Egfp-LBD, y hemos evaluado su expresión, localización y capacidad de recombinación tras la adición del ligando mibolerona. Los resultados indican que ambos sistemas pueden regular la actividad recombinasa, destacando que la proteína doble ofrece un mayor control basal, mientras que la triple muestra mayores niveles de inducción.

Para evaluar el potencial del sistema β /six en los modelos murinos desarrollamos dos líneas sustrato: 1. una línea transgénica que llevaba el casete de RAGE (six-pur^R-six-

LacZ) (Tgrec), y 2. una línea KO que llevaba el casete sustrato (six-neo^R-six) sustituyendo el *enhancer* del TCR β (KOsix).

La línea murina transgénica a la β -rec bajo el promotor proximal de Lck (Tg β) ya había sido establecida en el laboratorio y demostrado expresar la β -rec de forma funcional y específica de tejido.

Los ratones doble transgénicos (Tgrec/Tg β and KOsix/Tg β) permitieron la evaluación de la actividad recombinasa en dos sustratos diferentes.

La línea doble transgénica (Tgrec/Tg β) confirmó la expresión selectiva de β -rec. En los análisis por PCR la banda de recombinación fue detectada en los órganos linfoides y las poblaciones linfocitarias T, confirmando que la β -rec es activa en timo, bazo y ganglios, pero no en los órganos control. De las poblaciones de linfocitos T la máxima recombinación se obtuvo en SP (CD4⁺CD8⁻ o CD4⁺CD8⁺), siendo la banda no recombinada muy minoritaria. La actividad β -rec en linfocitos T periféricos fue muy alta, siendo difícil de detectar el sustrato en su forma no recombinada.

La línea KOsix se generó usando como modelo una línea de Cre desarrollada anteriormente. Tras demostrar su capacidad de recombinación *in vitro*, se modificaron las células ES y se verificó su capacidad de recombinación tras la electroporación de la β -rec.

En la línea doble transgénica (KOsix/Tg β) se demostró la expresión funcional de la β -rec. La presencia de la banda de recombinación se analizó por PCR en diversos órganos. Los resultados mostraron claramente la banda de recombinación exclusivamente en los órganos de expresión de la β -rec. Respecto a las diferentes poblaciones linfocitarias, en los linfocitos T SP de órganos linfoides secundarios se alcanzó la práctica totalidad de sustrato recombinado.

Los resultados presentados en este trabajo sustentan la utilidad futura del sistema β /six como herramienta para la modificación condicional del genoma eucariota, usada tanto de forma independiente como en combinación con los sistemas existentes.

INTRODUCCIÓN

1. LA MANIPULACIÓN DEL GENOMA

1.1. El ratón como modelo experimental

Se ha intentado manipular el genoma desde que se demostró que el material responsable de la herencia de los caracteres residía en el ADN. Sin embargo, no fue hasta los años 60-70 cuando se pudo introducir por primera vez ADN exógeno en células eucariotas *in vitro*. En 1974 se generaron los primeros ratones modificados genéticamente (Jaenisch and Mintz, 1974) y la transgénesis en la línea germinal de mamíferos murinos se logró a principios de los 80; la delección del primer locus genómico se consiguió en 1987 (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987), demostrándose posteriormente la transmisión a la línea germinal de la modificación (Thompson et al., 1989). Las modificaciones obtenidas con la manipulación génica están encaminadas a dos metas principales: a su desarrollo como modelos de estudio en ciencia básica o aplicada y a su utilización como nuevas fuentes de agentes farmacéuticos u órganos compatibles al trasplante en humanos.

Actualmente existen líneas transgénicas de numerosas especies, tanto animales como vegetales (anfibios, pollos, peces, insectos, nematodos, cerdos, conejos, tabaco, tomate, arroz, etc.) obtenidas mediante manipulación génica (Murphy and Carter, 1993) y, aunque una gran variedad de otros mamíferos (ratas, cerdos, cánidos y primates) constituyen en principio mejores modelos para el estudio de patologías humanas, es únicamente en ratón donde las (in)activaciones génicas se obtienen de forma rutinaria: ¿Por qué?

El ratón es el modelo de estudio por excelencia debido principalmente a disponer de la secuencia completa de su genoma (*International Mouse Genome Sequencing Consortium*) (<http://www.informatics.jax.org/>; <http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes/>) (Blake et al., 2002; Eppig et al., 2012; Waterston et al., 2002), lo cual, unido al desarrollo de nuevas tecnologías, ha permitido y mejorado la generación de modelos de patologías humanas (Mattison et al., 2009; van der Weyden et al., 2002). Además se trata de la única especie de la cual se han podido obtener células madre embrionarias (*Embryonic Stem*, ES) que den lugar, de forma rápida, eficaz y fidedigna, a transmisión germinal tras su manipulación génica *in vitro* (Bradley et al., 1984; Limaye et al., 2009). Recientemente, sin embargo, se ha logrado la generación de células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem cells*, iPSCs), tanto en humano como en otras especies animales (mono, rata, cerdo, perro, caballo, etc.); aún son necesarios estudios que garanticen su funcionalidad sin las limitaciones y la problemática que conllevan, pero es un campo muy prometedor (Singh et al., 2015). Por último es de destacar su similitud anatómica, fisiológica y genética con el ser humano (prácticamente todos los genes humanos tienen un homólogo en ratón) y su relativamente corto ciclo de vida, fundamental en los estudios de desarrollo y envejecimiento. Por todo ello existen en la actualidad muchísimos modelos de transgénesis murina, tanto de deficiencia o pérdida de una función génica (*knockout*, KO), como de ganancia o sobreexpresión (transgénico, Tg) o reemplazo o modificación en un locus específico (*Knockin*, KI), que tienen como objeto el estudio de mecanismos fisiológicos (organogénesis, inmunología, neurología, reproducción, comportamiento, etc.) o patológicos, y cuya caracterización permite una acertada selección de la diana de actuación correspondiente a cada caso (Prosser and Rastan, 2003).

Aprovechando el avance simultáneo en cuanto a la bioinformatización, se están intentando catalogar todos los datos que se poseen sobre las líneas de ratones transgénicos (cuyo número no deja de aumentar continuamente) en numerosas bases de datos de páginas web, entre las que destacamos las relacionadas en la tabla 1. Además se están realizando varios proyectos colaborativos internacionales enfocados al agrupamiento tanto de datos como de muestras biológicas de ratones transgénicos que de este modo se puedan distribuir fácilmente entre la comunidad científica. Uno de ellos, el *Internacional Knockout Mouse Consortium* (IKMC) (<http://knockoutmouse.org/>) (Bradley et al., 2012) tiene como objetivo principal la creación del banco mundial de ratones KO de todos los genes del genoma murino, para ofrecer en el futuro la posibilidad de estudiar cada gen

en cualquier momento del desarrollo mediante el sistema Cre/loxP, utilizando la expresión específica e inducible del gen de la recombinasa Cre. El IKMC lo componen 4 proyectos, cada uno de los cuales integra numerosas organizaciones científicas:

- KOMP, *Knockout Mouse Project*, EEUU (<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/>), con el objetivo de generar los ratones KO para cada gen endógeno (Austin et al., 2004) y caracterizarlos (International Mouse Knockout et al., 2007).
- EUCOMM, *European Conditional Mouse Mutagenesis Program*, UE (www.eucomm.org), con el objetivo de modificar células ES en las que cada gen se flanqueará con secuencias loxP, creando así un banco de animales KO condicionales (Friedel et al., 2007).
- NorCOMM, *North American Conditional Mouse Mutagenesis Project*, Canadá (<http://www.norcomm.org/index.htm>).
- TIGM, *Texas Institute for Genomic Medicine*, EEUU (www.tigm.org).

Base de Datos	Página WWW	Descripción
Mouse Genome Database	http://www.informatics.jax.org	Genome Informatics (MGI). Permite el acceso a datos de genética, genómica y biología del ratón.
Medical Research Council. Mammalian Genetics Unit	http://www.mgu.har.mrc.ac.uk	Facilita información sobre abordajes, tanto sistémicos como dirigidos, para el estudio de la función génica con especial atención a modelos de ratón para el estudio de enfermedades genéticas humanas.
The Whole Mouse Catalog	http://www.muridae.com/wmc	Facilita datos biotecnológicos y enlaces a Internet para rata y ratón.
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.gov/homology/	Contiene mapas comparativos, interactivos, de genes de rata, ratón y humanos.
Transgenic and Targeted Mutant Animal Database	http://www.ornl.gov/sci/techresources/trans/hmepg.html	Contiene información de investigadores sobre animales transgénicos; actúa como repositorio de datos aún no publicados.
International Knockout Mouse Consortium	http://www.knockoutmouse.org/	Consolida la información sobre todos los animales KO generados.

Tabla 1. Relación de las principales bases de datos sobre genética de ratón a nivel mundial. Muestran a la comunidad científica de todo el mundo las modificaciones realizadas en ratón, actualizadas, de modo que se eviten en lo posible duplicidades innecesarias y se posibilite un avance científico más rápido y menos costoso.

1.2. Manipulación génica germinal

La manipulación génica puede ser somática (con la modificación de un grupo celular en un organismo adulto) o germinal (lo que implica una modificación en las células germinales que darán lugar al individuo); es ésta última la que se desarrolla en este trabajo, y por ello nos centraremos en su análisis detallado, limitándonos por esa misma razón a los estudios en ratón, modelo de estudio en esta tesis.

La manipulación germinal debe ocurrir en estadios tempranos del desarrollo embrionario, y para ello podemos emplear diversos tipos celulares: células germinales no fertilizadas, células germinales fertilizadas (cigotos) antes o después de la fusión de los pronúcleos, células en estadios previos a la formación del blastocisto, células ES y células espermáticas. Todas estas son las opciones que presenta esta metodología y todas ellas están en desarrollo en numerosas especies animales (DeMayo and Tsai, 2001; Niemann et al., 1999; Smith, 1999; Wolf et al., 2000). Sin embargo la mayoría presentan numerosos problemas aún por resolver y únicamente cigotos y células ES se emplean de forma generalizada en las manipulaciones génicas murinas, siendo los que nosotros hemos elegido para generar nuestros modelos murinos de transgénesis y KO.

Para introducir el ADN exógeno en las células a modificar, normalmente se emplean la electroporación o la microinyección, pero existen otros métodos tanto a nivel germinal como somático (Smith, 2002), aunque tienen una mucho menor implantación. Destacaremos la transducción retroviral o lentiviral (la cual se verá más adelante, pues

es de aplicación directa en este trabajo experimental), la coprecipitación del ADN con moléculas insolubles (fosfato cálcico, DEAE-dextrano), la transducción por otros tipos de virus (herpes virus, adenovirus, virus asociados al adenovirus, *Adeno Associated Virus*, AAV), la transferencia mediada por liposomas (muy utilizada en líneas celulares), la inyección citoplasmática y por último el bombardeo de partículas.

1.2.1. Electroporación en células ES y *gene targeting*

Las células ES se obtienen del cultivo de las células extraídas de la masa interna de un embrión temprano, el blastocisto, y pueden mantenerse en proliferación varias semanas sin que se altere su cariotipo (Evans and Kaufman, 1981), manteniendo su totipotencia (Bradley et al., 1984; Torres, 1998) incluso tras sufrir modificaciones génicas (Doetschman et al., 1986).

La electroporación consiste en la generación de pulsos eléctricos muy intensos que inciden en una suspensión formada por las células y ADN (en nuestro caso el vector de *targeting* linearizado), desestabilizando las membranas celulares y permitiendo la entrada de dicho ADN hasta el núcleo (Lurquin, 1997); es un método rápido y económico de modificación de células en cultivo, donde el número de copias integrado en cada célula puede ser moderadamente regulado. La electroporación es el método de elección en la manipulación de ES (Chu et al., 1987) al permitir la modificación de un gran número de células, lo cual es fundamental, pues la mayor parte de las integraciones que se van a producir por esta vía son aleatorias, no homólogas.

El proceso puede verse esquematizado en la figura 1: el ADN modificado, que contiene el fragmento génico de interés flanqueado por dos brazos homólogos al sitio de integración, entra en las ES por electroporación y se integra en el genoma mediante recombinación homóloga en un proceso denominado genéricamente *gene targeting* (Smithies et al., 1985), quedando introducida nuestra modificación en el lugar deseado (Doetschman et al., 1987; Hall et al., 2009; Pirity et al., 1998; Thomas and Capecchi, 1987). Estas células ES modificadas pasan entonces por diversas selecciones, típicamente una positiva (gracias a un gen de resistencia introducido entre los dos brazos de homología) y otra negativa (debido a la presencia de un gen tóxico al extremo del vector, fuera de la región de homología) (Mansour et al., 1988), que enriquecen el cultivo en las células que han sufrido el proceso de recombinación homóloga deseado (donde el gen de selección negativa no se integra) frente al resto de potenciales y mucho más favorables integraciones aleatorias (donde generalmente se integra todo el vector) (Chen and Bradley, 2000; Mansour et al., 1988). Tras la confirmación genética de la modificación, las células ES modificadas son inyectadas o agregadas en un blastocisto o mórula, respectivamente, de otra cepa murina, donde son capaces de contribuir hasta en un 80% del embrión y futuro animal (es de destacar que aunque tenga su problemática particular, también por introducción de ES en embriones tetraploides se obtienen con gran eficacia líneas murinas modificadas). La contribución de las ES al animal derivado se determina generalmente en el color del pelaje del animal, distinto en las diversas cepas murinas que lo forman (quimerismo).

Si las células ES modificadas contribuyen a la formación de la línea germinal del animal, la modificación se podrá, normalmente, transmitir a la descendencia y permitirá el establecimiento de la línea murina correspondiente (Capecchi, 1989).

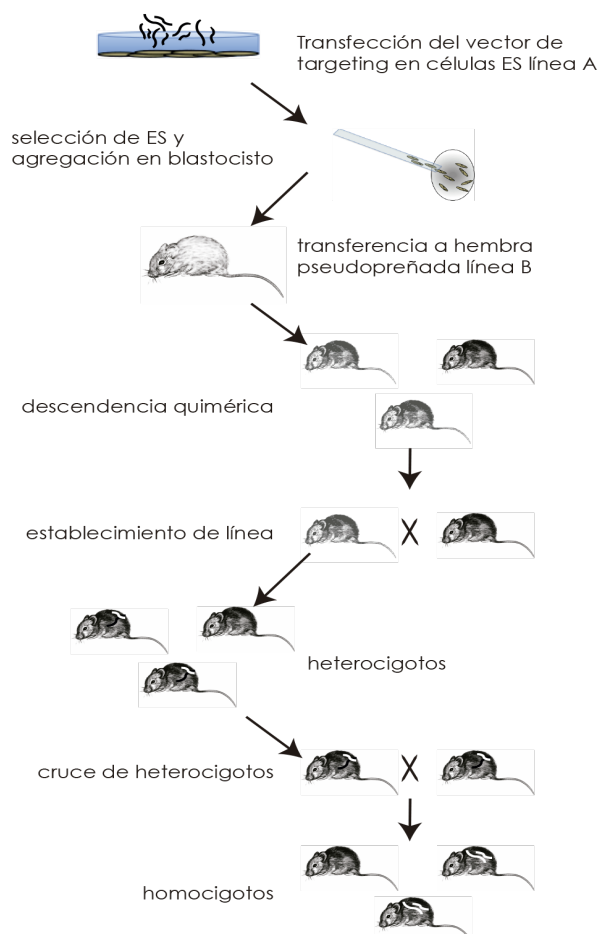


Figura 1. Esquema representativo del proceso de generación de un ratón modificado mediante ES manipuladas por electroporación.

El genoma de las células ES se modifica por recombinación homóloga con el vector de *targeting*, el cual ha sido introducido en la célula por electroporación. Posteriormente las células ES seleccionadas serán agregadas en un blastocisto de otra cepa murina y se transferirán a una hembra receptora. La descendencia será quimérica para la modificación en mayor o menor medida; en su cruce con animales wt, los animales que portaban la modificación en la línea germinal, transmitirán dicha modificación a su descendencia, generando la línea murina modificada en heterocigosis. El cruce de ratones heterocigotos entre sí dará lugar a descendencia homocigota.

A la hora de diseñar un experimento de *gene targeting* hay que tener en cuenta el largo período necesario hasta la obtención y establecimiento de la línea murina, por lo que se debe tener especial cuidado en el diseño del vector de *targeting* (que en muchos casos determinará la eficacia de la recombinación homóloga) y de la estrategia de detección de los clones de ES que portarán la modificación (Cheah and Behringer, 2001; Hasty et al., 1991; Mansour, 1990).

En la actualidad éste es el método de elección en la manipulación génica controlada de organismos superiores (Bouabe and Okkenhaug, 2013) y los numerosos modelos murinos existentes que utilizan esta tecnología han sido diseñados tanto para la inactivación (en muchos casos condicional) como para la activación, reemplazo o *gene trap* del gen de interés (Cohen-Tannoudji and Babinet, 1998; Gao et al., 1999; Hasty et al., 2000; Lewandoski, 2001; Metzger and Feil, 1999; Muller, 1999; Rossant and Nagy, 1995; Stanford et al., 2001).

1.2.2. Microinyección en pronúcleos de la célula germinal fertilizada (cigoto)

La microinyección (Wilkie et al., 1986) (Fig. 2) básicamente consiste en la introducción con una micropipeta del ADN modificado (aproximadamente unas 200 moléculas) en uno de los pronúcleos del cigoto. El pronúcleo modificado se transfiere a una madre pseudopreñada, donde se desarrollará. En la progenie obtenida, una media del 5% al 40% resulta ser o heterocigota o quimérica en mayor o menor medida, según cuando se haya integrado el ADN en el genoma, y de ellos, únicamente los que porten el transgen en la línea germinal darán lugar a transmisión, y con ello a la obtención de la línea murina deseada.

El ADN se integra de forma aleatoria; sin embargo se sabe que normalmente los animales transgénicos poseen una única integración con un número de copias variable (normalmente de 1 a 50 copias en uniones cabeza-cola) (Gordon and Ruddle, 1985), pero

en caso de existir más de una integración, éstas irán segregando (a menos que estén ligadas genéticamente) en los sucesivos cruces encaminados a la obtención de la línea.

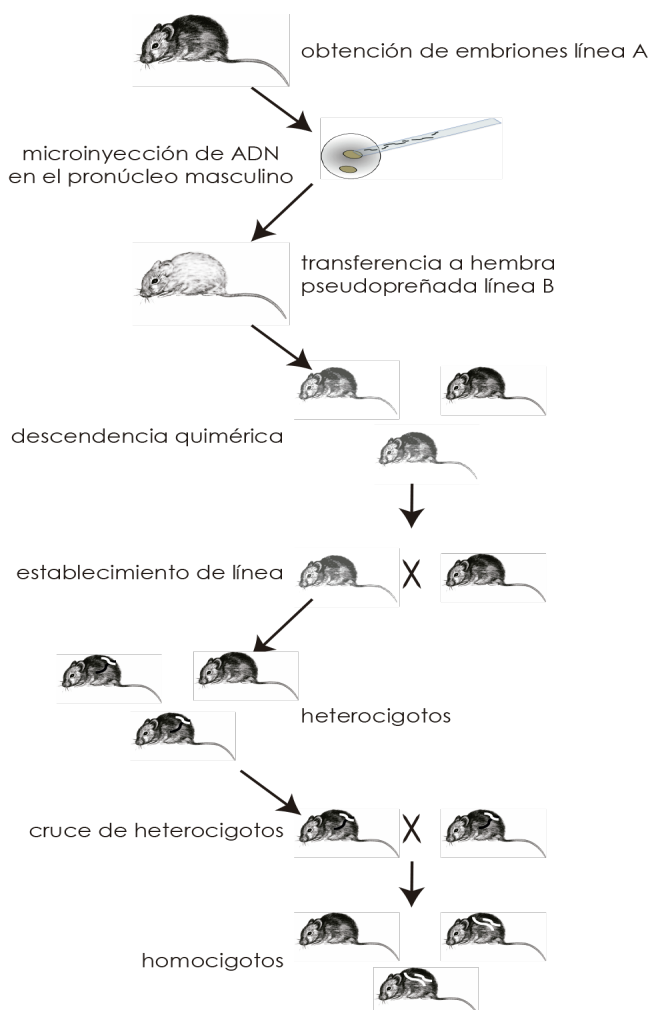


Figura 2. Esquema representativo del proceso de generación de un ratón modificado por microinyección de ADN en uno de los pronúcleos de un cigoto.

El ADN modificado se microinyecta en uno de los pronúcleos (generalmente el masculino) de un cigoto y éste se transfiere a una hembra receptora. La descendencia será transgénica o quimérica para la modificación; igual que en el caso anterior, en su cruce con animales wt, los animales que portaban la modificación en la línea germinal, transmitirán dicha modificación a su descendencia, generando la línea murina modificada en heterocigosis. El cruce de ratones heterocigotos entre sí dará lugar a descendencia homocigota.

La microinyección tiene un grandísimo potencial y actualmente es el método de transgénesis germinal más utilizado en la mayoría de las especies animales, donde no se dispone de ES (Mullins and Mullins, 1993), a pesar de ser un método complejo que requiere una gran experiencia por parte del manipulador. Esta técnica es además más rápida que la modificación de las ES y puede resultar extremadamente informativa en cuanto al fenotipo producido por la expresión del transgen (Clapham et al., 2000), pero implica la integración aleatoria del ADN exógeno en un lugar indeterminado del genoma, la cual conlleva una mayor problemática *per se* y en el establecimiento de la línea. Podemos encontrarnos que el lugar de integración afecte al transgen en cuanto a su silenciamiento, nivel de expresión y pérdida de especificidad celular (Clark et al., 1994). Por otro lado, la inserción del transgen puede también afectar al sitio de integración, causando la alteración e incluso inactivación de un gen endógeno (Doerfler et al., 1997).

Por todo esto cada línea transgénica obtenida debe ser tratada de forma independiente, teniendo en cuenta la expresión génica particular y los efectos primarios (debidos al transgen *per se*) y secundarios (debidos al efecto de la sobreexpresión en el resto de células del tejido y en señales procedentes de otros órganos) propios del sitio de integración y el número de copias integradas. Este procedimiento suele ser, a pesar de esta idiosincrasia, uno de los primeros pasos en la caracterización de una función génica (Harris, 2001). En este sentido es de destacar que donde el futuro ofrece un mayor interés no es en la sobreexpresión (que puede dar lugar a fenotipos alterados debido al potencial efecto tóxico del transgen), sino en la expresión a niveles fisiológicamente coherentes del gen de

interés (Koch et al., 1995).

La posibilidad de introducción de un promotor que dirija la expresión del transgen ha expandido las áreas de aplicación de esta metodología, entre las que destacamos:

- La expresión ubicua del transgen con promotores genéricos fuertes (Choi et al., 1991).
- La expresión génica restringida tisularmente con promotores específicos de tejido o linaje (Kwak et al., 2004).
- La expresión génica regulada de forma temporal con promotores y sistemas inducibles (Moser et al., 2001; Saez et al., 1997).
- La pérdida en un tejido determinado de una función génica utilizando promotores específicos de dicho tejido fusionados a un gen tóxico o letal, o a una molécula de ADN antisentido al gen de interés (Delaney et al., 1996; Sokol and Murray, 1996).
- La disminución (Knock-down) de una proteína en el organismo con ARN interferente pequeño (small interference RNA, siARN) (Saito et al., 2005).

1.3. Limitaciones de la transgénesis y *gene targeting* convencionales: necesidad de herramientas condicionales

En los comienzos, las tecnologías convencionales de generación de animales transgénicos y KO se convirtieron en herramientas de un valor incuestionable en el modelado de desórdenes genéticos, en la determinación de nuevas funciones génicas, en la evaluación de toxinas y potenciales compuestos farmacéuticos y en general en el desarrollo de la investigación tanto básica como aplicada. Sin embargo, pronto surgió la necesidad de generar nuevos modelos murinos de manipulación génica que ofreciesen un mayor control del que podían ofrecer los sistemas convencionales. En ellos, las modificaciones que se obtienen corresponden a la totalidad del organismo, lo que conlleva, indefectiblemente, ciertos problemas. Entre ellos el más importante es la letalidad embrionaria, ocasionada en el caso de delección de un gen fundamental para la embriogénesis o el desarrollo fetal del animal, lo que evidentemente impide su estudio posterior (Ferry et al., 2007; Kwak et al., 2004; Misra and Duncan, 2002; Wylie et al., 2003). Además, aun en el caso de que el animal alcance el estado adulto, pueden darse problemas de fertilidad o desórdenes sistémicos generalizados (Diebold et al., 1995).

Por otra parte el fenotipo buscado en un determinado tejido puede estar produciendo efectos citostáticos o citotóxicos debido a una expresión inadecuada, o sus efectos ser enmascarados por efectos más complejos al tener el gen eliminado o introducido múltiples funciones en otros tejidos y/o etapas del desarrollo (Kastner et al., 1995). Además, esta estrategia no sirve en el caso de querer estudiar genes involucrados en patologías que solamente afectan a un tejido o un tipo celular. Por último, podemos llegar a encontrarnos con la ausencia de fenotipo en los animales modificados, no porque no tengan alteración, sino por ser ésta compensada por genes redundantes (Chambon, 1996; Damkier et al., 2009) o por procesos adaptativos del animal.

Además, en muchos de los modelos murinos de *gene targeting* convencional, el casete de selección positiva (generalmente el gen de la neomicina fosfotransferasa, -neo^R-) se mantiene integrado en el genoma murino, lo cual puede ocasionar la alteración en la expresión de genes vecinos, así como del transgen en sí, en caso de tratarse de experimentos de Knockin (Lerner et al., 1993; Ohno et al., 1994; Pham et al., 1996; Rijli et al., 1994).

Es en este contexto en el que se desarrolló la recombinación específica de secuencia (RES) (Jones et al., 2005). Esta herramienta, que en un primer lugar se empleó para eliminar el casete de selección principalmente con Cre (Kaartinen and Nagy, 2001; Leneuve et al., 2003; O'Gorman et al., 1997; Xu et al., 2001), pero también con FLP (Farley et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Schaff et al., 2001), ha permitido además la delección o expresión del transgen de forma específica de tiempo y/o tejido en diversos organismos, entre ellos ratón

(DeMayo and Tsai, 2001; Gossen and Bujard, 2002; Kwak et al., 2004; Lewandoski, 2001), mosca (Rong et al., 2002) o plantas (Hoa et al., 2002; Lyznik et al., 2003).

2. RECOMBINASAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA (REC)

La recombinación específica de secuencia (RES) se distingue de la recombinación homóloga y la recombinación ilegítima en la gran especificidad de sus componentes: es un proceso en el cual una enzima, la recombinasa, reconoce dos secuencias específicas y cataliza el intercambio de cadenas entre esas dos secuencias de ADN (Stark et al., 1992). En este proceso la enzima (Rec) reconoce dichas secuencias, los llamados sitios de reconocimiento, específicos y exclusivos a cada recombinasa; la recombinasa no sólo los reconoce y se une a ellos, sino que también los une entre sí conformando el complejo sináptico de la reacción, lo que permite el corte y reagrupamiento de las cadenas de ADN (Nash, 1996). Esta reacción no conlleva ganancia o pérdida de material genético, por lo que también se denomina recombinación conservativa.

Todos los sitios de reconocimiento, siendo específicos a cada recombinasa, poseen un rasgo en común: su asimetría. Se trata de secuencias cortas (de unas pocas decenas de pares de bases a unos centenares) que comprenden dos regiones laterales y una pequeña y asimétrica región interna. Las recombinasas poseen la cualidad no solo de selectividad de secuencia, sino también de direccionalidad, puesto que según el sentido que presenten los sitios de reconocimiento (determinado por la región asimétrica) la enzima es capaz de catalizar diversas reacciones (aunque es de destacar que no todas las recombinasas son capaces de catalizar integración, resolución, inversión y/o translocación), como vemos en la figura 3:

A) Resolución del fragmento flanqueado por los sitios de reconocimiento: Esto ocurrirá en el caso de que ambos sitios se encuentren en una misma molécula de ADN (reacción intramolecular) y en el mismo sentido (orientación directa).

B) Integración de dos moléculas de ADN: Este fenómeno tendrá lugar en el caso de que cada sitio de reconocimiento sea aportado por una molécula de ADN distinta (reacción intermolecular) y donde una cadena sea lineal y la otra circular.

C) Inversión del ADN que se encuentra entre los dos sitios de reconocimiento: Esta reacción tendrá lugar en el caso de que se encuentren en la misma molécula de ADN (reacción intramolecular) pero tengan sentidos opuestos (orientación inversa).

D) Traslocación: Se trata de una reacción intermolecular donde ambas moléculas de ADN son lineales (por ejemplo dos cromosomas distintos en eucariotas), de modo que ninguna puede integrar a la otra, sino que intercambian las cadenas.

Es de destacar que la propia naturaleza de la reacción implica que los dos sitios de reconocimiento intercambien parte de su secuencia en el desarrollo de la misma.

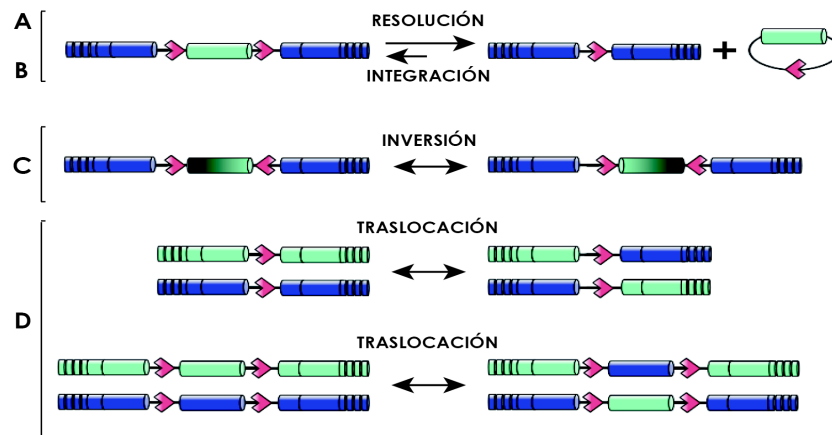


Figura 3. Reacciones catalizadas por las recombinasas específicas de secuencia. Destacar que la secuencia de los sitios de reconocimiento de las recombinasas es asimétrica, lo que les confiere asimetría a ellas también. **A) Reacción de resolución o deleción:** Los dos sitios de reconocimiento de la enzima (puntas de flecha rosas) se encuentran en orientación directa en una misma cadena de ADN lineal (cilindros azules), lo que hará que en la recombinación se escinda el fragmento que se encontraba entre ellos (cilindro verde) junto con uno de los sitios de reconocimiento. **B) Reacción de integración:** Se trata de la reacción inversa a la anterior, y en caso de que se puedan dar las dos, ésta estará menos favorecida; una molécula de ADN circular que tiene un sitio de reconocimiento se integra en el sitio de reconocimiento de una molécula de ADN lineal, quedando introducido un fragmento de ADN en la molécula lineal. **C) Reacción de inversión:** Los dos sitios de reconocimiento de la enzima se encuentran inversamente orientados en una misma cadena de ADN lineal, ocasionando la inversión del fragmento genómico interno. **D) Reacción de traslocación:** Esta reacción implica la existencia de dos cadenas de ADN lineales; lo que ocurre es un intercambio de ADN entre ellas a través del intercambio de la secuencia de los sitios de reconocimiento. Si cada cadena únicamente aporta un sitio de reconocimiento, el genoma a partir de ellos se intercambiará, mientras que si cada cadena aporta dos sitios de reconocimiento, lo que se intercambiará será únicamente el fragmento que se encuentra entre ellos.

Actualmente se han descrito más de quinientas recombinasas específicas de secuencia. Éstas se han aislado de muy diversos orígenes (transposones, procariotas o víricas), donde ejercen diferentes funciones biológicas (Nash, 1996):

- Regular la expresión de diversos genes de fagos y plásmidos que darán proteínas alternativas de superficie, lo que aumenta su adaptabilidad al medio (inversión) (van de Putte and Goosen, 1992).
- Activar diversos procesos del desarrollo por resolución génica (esporulación, diferenciación de quistes) (Sato et al., 1990).
- La resolución de dímeros para facilitar su segregación en la posterior división celular (Sherratt et al., 1995).
- La determinación del estado biológico de ciertos fagos, bien lítico o bien inactivo (como profago) (Landy, 1989).

Su clasificación se basa en el residuo responsable de la catálisis (aquel que ataca la unión fosfodiéster del ADN para producir el corte de los extremos a recombinar) y en su homología. Se definen de este modo dos familias principales (Hallet and Sherratt, 1997): la familia de las tirosina recombinasas (con las subfamilias de integrasas de tipo simple y complejo) (Esposito and Scocca, 1997) y la familia de las serina recombinasas (con las subfamilias de resolvers e integrasas de fagos y transposasas) (Smith and Thorpe, 2002). Ambas familias son capaces de catalizar la reacción de recombinación en ausencia de cofactores de alta energía como NTPs o dNTPs (Stark et al., 1992), siendo la energía liberada en la disociación de enlaces fosfodiéster la que se utiliza para generar las nuevas uniones (Rice, 2005).

Cada enzima reconoce exclusivamente una secuencia determinada, unos sitios de

reconocimiento específicos; estos sitios pueden tener una secuencia idéntica, como en el caso de las serina recombinasas (a la que pertenece la β -rec) o tirosina recombinasas simples (como las integrasas Cre o FLP) o, por el contrario, pueden tener secuencias diferentes, como en el caso de las tirosina recombinasas complejas (donde está incluida la integrasa Int del fago λ).

2.1. Familia de las tirosina recombinasas: Cre y FLP

Esta familia comprende en la actualidad más de trescientas enzimas provenientes de fagos, bacterias y levaduras (Grainge and Jayaram, 1999; Nunes-Duby et al., 1998). Se trata de un grupo muy heterogéneo de enzimas, tanto desde un punto de vista estructural (únicamente han quedado conservados cuatro residuos que intervienen en la catálisis: la tétrada RHRY), como funcional (comprende resolvasas, invertasas, integrasas y transposasas) (Esposito and Scoocca, 1997). Las recombinasas más conocidas y estudiadas de esta familia son: Cre (*Creating REcombination*) del fago P1 (Abremski and Hoess, 1984) y FLP (*FLiPping*) del plásmido de 2 μ m de *Saccharomyces cerevisiae* (Cox, 1983), las cuales han dado lugar a numerosos modelos de modificación génica condicional en diversos organismos superiores (Deng, 2014; Peng et al., 2014). Con un desarrollo menor en organismos eucariotas pero también ampliamente estudiadas en el entorno procariota destacamos la integrasa (Int) del fago λ (Nash and Pollock, 1983) y las recombinasas bacterianas XerC y XerD de *Escherichia coli* (Sherratt et al., 1995).

Las recombinasas de esta familia son capaces de realizar reacciones tanto intramoleculares (resolución e inversión) como intermoleculares. La reacción transcurre de forma escalonada: en primer lugar se forma un intermedio de reacción tipo *Holliday junction* por intercambio entre dos de las cadenas de ADN. Posteriormente, con el intercambio de las otras dos cadenas, se forman los productos finales de la recombinación. Cada uno de sus sitios de recombinación está compuesto por dos fragmentos antiparalelos de unión al enzima que se encuentran flanqueando un fragmento interno asimétrico; en el caso de Cre y FLP, éstos se denominan loxP (*Locus of Crossover*) y FRT (*FLP Recombination Target*), respectivamente.

Podemos distinguir dos grupos bien diferenciados dentro de las tirosina recombinasas: las integrasas de tipo simple (donde se encuentran Cre y FLP) y las integrasas de tipo complejo (donde se ubican Int, XerC y XerD). El primer grupo se caracteriza porque la enzima y su sustrato (ADN) son los únicos elementos necesarios para que se lleve a cabo la reacción (Abremski et al., 1983; Dixon et al., 1995), mientras que en los sistemas complejos los sitios de reconocimiento presentan secuencias adicionales que han de ser necesariamente reconocidas por proteínas accesorias (HU, IHF, FIS, Xis) para que ocurra la reacción, pues actúan como cofactores de la misma (Franz and Landy, 1995; McCulloch et al., 1994).

2.2. Familia de las serina recombinasas: ϕ C31, Tn3, $\gamma\delta$, β

Esta familia comprende más de un centenar de miembros y sigue en continua ampliación (Smith and Thorpe, 2002). Se trata también de una familia muy versátil, con tres grupos bien diferenciados: resolvo/invertasas, integrasas y transposasas. Las que poseen un mayor desarrollo y aplicación a modelos eucariotas son la integrasa ϕ C31 del bacteriófago de *Streptomyces* (Groth et al., 2000; Rubtsova et al., 2008), la resolvasa $\gamma\delta$ del transposón TN1000 (Schwikardi and Droge, 2000) y la β -rec del plásmido pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (Díaz et al., 1999).

Estas recombinasas son capaces de realizar alguna(s) de las reacciones citadas anteriormente, pero no todas. Como hemos visto tenemos tres grupos funcional y estructuralmente bien diferenciados:

- Las resolvo/invertasas comprende las resolvasas (Tn3, $\gamma\delta$ y Tn21), las invertasas (Hin y Gin) y las resolvo/invertasas (grupo al que pertenece la β -rec), con los dominios N-terminal

catalítico y C-terminal de unión al ADN.

- Las serina-recombinasas de fagos ϕ C31 y TnpX, que catalizan integración o resolución y poseen un dominio C-terminal de unión al ADN mucho más largo que las anteriores.
- Las transposasas, como IS607, de igual tamaño que las resolvers/invertasas pero con el dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal.

Este trabajo se basa en las reacciones mediadas por la β -rec, por lo que vamos a describir con más detalle el grupo en el que se ubica.

Las resolvers/invertasas catalizan la reacción de recombinación en una única etapa en la que las cuatro cadenas de ADN son cortadas y reagrupadas a la vez, dando lugar a los productos de recombinación correspondientes (Droge et al., 1990; Johnson and Bruist, 1989).

El primer tipo de recombinasas de este grupo, las resolvers (Tn3, $\gamma\delta$, Tn21), catalizan exclusivamente reacciones intramoleculares de resolución. Sus sitios de reconocimiento, res, poseen tres subsitios adyacentes I, II y III, cada uno compuesto por una repetición invertida imperfecta. La rotura de las cadenas de ADN se produce en el subsitio I, mientras que los otros dos subsitios actúan facilitando la formación del complejo sináptico. El hecho de que la resolvasa se una a los subsitios II y III permite la formación del complejo sináptico, siendo ésta posiblemente la razón por la que éste tipo de recombinasas no requiere proteínas accesorias para realizar su función (Grindley et al., 1982; Rogowsky et al., 1985).

El segundo tipo de enzimas de este grupo lo constituyen las invertasas (Hin, Gin); estas enzimas se unen a sus sitios de reconocimiento, hix y gix, respectivamente, que constan únicamente de una repetición invertida. Cuando éstos se encuentran en orientación inversa, catalizan exclusivamente reacciones de inversión del fragmento de ADN que se encuentra entre ambos sitios. Estos sistemas requieren la existencia de una secuencia accesoria de ADN adyacente al sitio de reconocimiento que potencie la reacción, así como de la proteína del huésped FIS, que actúa como cofactor de la reacción facilitando la formación del complejo sináptico. Es de destacar que se han desarrollado mutantes tanto de resolvers como de invertasas que han perdido su selectividad y son capaces de catalizar reacciones tanto de resolución como de inversión (Arnold et al., 1999; Klippel et al., 1988; Sarkis et al., 2001).

Por último tenemos las resolvers-invertasas, que constituyen un grupo intermedio a los dos anteriores. Las resolvers-invertasas más estudiadas son la β -rec (de *Streptococcus pyogenes*) y la recombinasa Sin (de *Staphylococcus aureus*), las cuales son capaces de reconocer sus sitios de recombinación, six y resH respectivamente, cuando éstos se encuentran en una misma molécula de ADN, tanto en orientación directa como inversa (Alonso et al., 1996; Rojo and Alonso, 1994; Rowland et al., 2002).

Las resolvers-invertasas catalizan la delección (resolución) de un fragmento de ADN cuando éste se halla situado entre dos sitios six con orientación directa, mientras que si los dos sitios six presentan orientación inversa, lo que se produce son reacciones tanto de resolución como de inversión del fragmento interno (Canosa et al., 1998), dependiendo que ocurra una u otra del grado de superenrollamiento del ADN, así como de otros factores. Los sitios de reconocimiento de las resolvers-invertasas contienen dos subsitios adyacentes I y II, que la recombinasa reconoce y a los que se une de forma diferente (con mayor afinidad al I, que contiene dos fragmentos antiparalelos flanqueando un fragmento interno asimétrico); es necesaria además una proteína accesoria (Hbsu, HU, HMG1) para que establezca el ADN y se produzca la reacción de recombinación.

2.3. Aplicaciones de las recombinasas específicas de secuencia en modelos murinos: Diseño básico de los experimentos y modelos condicionales

De forma general las aplicaciones de los sistemas de RES se basan en la generación de dos

líneas murinas (una transgénica a la recombinasa y otra al sustrato de recombinación) que deben cruzarse entre sí para dar lugar a la descendencia doble transgénica, que es la que sufrirá la recombinación condicional, y con ello la modificación condicional que queremos estudiar (Friedel et al., 2011).

En la generación de la línea murina transgénica a la recombinasa, el gen de la recombinasa es introducido por microinyección en el cigoto (ver sección 1.2.2), mientras que en la generación de la línea transgénica al sustrato, el ADN puede ser introducido por microinyección en un cigoto o por electroporación en células ES (ver sección 1.2.1); ambas opciones dan lugar a modificaciones diferentes del ADN y por ello buscan objetivos distintos:

Si es por microinyección se busca generar un transgénico condicional (Knockin condicional), pero no se tiene control ni del lugar de inserción del transgen ni del número de copias integradas del mismo.

Si es por electroporación del vector de *targeting* en ES, el resultado es más complejo, pues el tipo de modificación génica condicional que obtendremos vendrá determinado por el fragmento de ADN que introduzcamos. En líneas generales podemos decir que si éste incluye uno o más exones fundamentales para la expresión o funcionalidad de un gen, el objetivo es el de generar un ratón condicional defectivo en dicha función génica (KO condicional), mientras que si contiene una señal de parada (colocado entre el promotor y el propio gen), lo que se pretende es la generación de un animal KI condicional. Como vemos, se trata de objetivos opuestos, donde ambos han demostrado proporcionar información complementaria en el estudio de las funciones génicas en ratón:

En la línea murina respondedora para la generación de un KO condicional, el gen elegido se encontrará flanqueado por los sitios de reconocimiento de la recombinasa, siendo perfectamente funcional antes de la recombinación puesto que dichos sitios se colocan en secuencias intrónicas que no afectarán la estructura y función del ácido ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic Acid, ARNm); tras el cruce con la línea transgénica a la recombinasa, se eliminará todo o parte de ese gen, dejando éste de ser funcional.

En la línea murina respondedora para la obtención de un animal KI condicional (tanto por electroporación como por microinyección), el transgen no se expresa hasta que en la descendencia doble transgénica el proceso de recombinación específica de secuencia elimina la señal de parada y se permite su transcripción y traducción.

Por otra parte se puede disminuir la actividad de una proteína sin llegar a eliminarla del todo: es el llamado *gene knock-down*. Destacamos el empleo conjunto de las recombinasas específicas de secuencia y el RNA interferente (RNAi o shRNA), de modo que logramos una disminución no total de un producto génico de forma condicional de tiempo y/o de tejido o línea celular (Heitz et al., 2014).

La gran utilidad de este sistema, y que le ha valido su rápido y amplio desarrollo (Chien, 2001; Ryding et al., 2001; Sauer, 1998; Williams and Wagner, 2000), es la posibilidad de conseguir el control del evento de recombinación al regular la expresión de la recombinasa en una forma específica de tejido, con promotores específicos (Agah et al., 1997; Brocard et al., 1997; Sreenath et al., 2003) o de tiempo, con promotores específicos de una etapa del desarrollo o empleando uno de los diferentes sistemas inducibles existentes (Kuhbandner et al., 2000; Vallier et al., 2001). El mayor logro en este sentido es la utilización conjunta de ambos métodos de control, donde la expresión y/o actividad de la recombinasa, además de quedar restringida a un tejido determinado, es inducida por la administración de un ligando exógeno (Metzger and Chambon, 2001; Weber et al., 2001). Estos modelos están demostrando la gran versatilidad de los sistemas de recombinación específica de secuencia (Nagy, 2000), permitiendo *a priori* la modificación de cualquier gen en un momento determinado de la vida del animal y en el tipo celular de interés (Branda and Dymecki, 2004; Gierut et al., 2014; Tronche et al., 2002; Zhang et al., 2012).

Tanto *in vitro* como *in vivo*, Cre y FLP han demostrado ser activas en una gran

variedad de tipos celulares, desde células indiferenciadas hasta células postmitóticas (Agah et al., 1997; O'Gorman et al., 1991; Sauer and Henderson, 1988). Esto ha hecho que sean las recombinasas específicas de secuencia de mayor utilización en la generación de modificaciones condicionales en ratón (ver más adelante), aunque otras recombinasas (β , Kw, R4, λ , ϕ C31, Dre, HK022 y TP901-1) ya han demostrado ser también funcionales en células de mamífero (Anastassiadis et al., 2009; Andreas et al., 2002; Christ et al., 2002; Diaz et al., 2001; Ringrose et al., 1997; Stoll et al., 2002) y están siendo objeto de estudios más detallados que determinen su aplicabilidad práctica real.

2.3.1. Modelos condicionales tisulares

Como hemos visto, la ventaja de estos modelos radica en que lo que se obtiene es un animal en el cual el gen de estudio se modifica de forma controlada en un determinado tejido o línea celular, quedando inalterado en el resto del organismo; para conseguirlo necesitamos una línea respondedora del *knockout* o *knockin* condicional y una línea transgénica a la recombinasa, donde se dirige la expresión de la enzima al tejido de elección mediante el empleo de promotores específicos.

2.3.1.1. Generación de ratones transgénicos a la recombinasa

El objetivo principal de estas líneas murinas es la aportación a la progenie del gen codificante de la recombinasa. Para lograr una recombinación condicional específica de tejido se necesita determinar con exactitud *in vivo* el patrón de expresión tisular del promotor, y con ello de la enzima, por lo que se han desarrollado y se siguen desarrollando líneas murinas que expresan proteínas de fusión entre las recombinasas y diversas proteínas marcadoras bajo el control de promotores muy diversos. La detección de dicho marcador, de forma sencilla y a menudo no lesiva al animal, permite al investigador seleccionar el promotor más concordante con sus objetivos antes de comenzar una gran parte del trabajo, ahorrando tiempo, trabajo y dinero.

Los marcadores más ampliamente utilizados son la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, gfp, de la medusa *Aequorea victoria*) u otras variantes fluorescentes (*Cyan Fluorescent Protein*, cfp; *Yellow Fluorescent Protein*, yfp) que permiten la visualización de células vivas) (Chalfie et al., 1994; Kawamoto et al., 2000; Mao et al., 2001); enzimas que degradan un sustrato cuyo producto es coloreado (e.j. la β -galactosidasa, β -gal, codificada por el gen *LacZ*) que permiten la identificación de células de forma individual (Akagi et al., 1997; Florin et al., 2004; Mao et al., 1999; Sinnayah et al., 2004; Soriano, 1999); y en menor medida la fosfatasa alcalina (que proporciona información de la morfología celular) (Awatramani et al., 2001).

Por otra parte, estos marcadores permiten un seguimiento muy específico de la RES a lo largo de la embriogénesis y el desarrollo, y se pueden usar de forma aislada o combinada en el estudio de linajes celulares de procesos fisiológicos o patológicos, permitiendo un análisis mucho más completo (Abe and Fujimori, 2013; Kretzschmar and Watt, 2012).

En la actualidad están disponibles más de quinientas líneas murinas transgénicas de Cre (Hao et al., 2002; Orban et al., 1992; Zhou et al., 2002a) y FLP (Dymecki and Tomasiewicz, 1998; Vooijs et al., 1998), que pueden consultarse en:

- *Textpresso Site Specific Recombinases* (<http://ssrc.genetics.uga.edu/>), *Cre-Zoo* (<http://bioit.fleming.gr/crezoo/>).
- *CreXmice* (http://nagy.mshri.on.ca/cre_new/index.php).
- *Jackson Laboratory Cre Repository* (<http://cre.jax.org>).
- *Mutant Mouse Regional Resource Center* (<http://www.mmrrc.org>).
- *Create* (Coordination of Cre resources, <http://creline.org/>, <http://www.creportal.org/>).
- *MGI Cre* (Recombinase Cre portal, <http://www.creportal.org>).
- *Institut Clinique de la Souris* (ICS, <http://www.ics-mci.fr/mousecre/>).

En ellos se expone una relación de las líneas, bastante extensa, y en ella se pueden localizar tanto aquellas que permiten una expresión ubicua de la enzima (con promotores fuertes y genéricos) (Madisen et al., 2010) como otras que la restringen a una o varias líneas celulares (con promotores específicos de tejido) (Dacquin et al., 2002) o a un momento determinado (con sistemas inducibles de expresión y actividad) (Nagy et al., 2009). En el caso de no disponer de una adecuada al tejido de estudio, cada grupo genera la suya propia y comprueba su patrón de expresión siguiendo esta metodología (Cui et al., 2004; Jin et al., 2003; Moon et al., 2000; Theis et al., 2004).

2.3.1.2. Generación de ratones *Knockin* condicionales

El objetivo de la generación de animales KI condicionales (Hanks et al., 1995) es la producción a gran escala de una proteína con fines médicos o permitir la expresión de un gen (endógeno o exógeno al animal) en un tejido determinado, de forma que se pueda estudiar su función en ese órgano sin padecer los problemas derivados de la expresión ubicua de dicho transgen en el organismo completo. La metodología básica consiste en la introducción del transgen bajo un promotor específico de tejido; además, entre el promotor y el gen se coloca un casete que contiene una secuencia de parada de transcripción/traducción (opcionalmente tras un gen de selección positiva) flanqueado por los sitios de reconocimiento de la recombinasa (Sauer, 1993), lo cual impide la expresión del transgen. La diferencia distintiva es que este casete se introduce mediante recombinación homóloga en ES en un locus específico y controlado. Una vez obtenidas las ES modificadas y derivada la línea murina portadora del transgen (siendo éste aún inactivo), la señal de parada es eliminada (por ejemplo cruzando esta línea con otra transgénica a la recombinasa, donde ésta esté bajo el control del mismo u otro promotor), permitiendo en la progenie la expresión y análisis del transgen en el tejido diana.

Esta estrategia resulta muy útil, al ser condicional de tejido e introducir una única copia del transgen, en la sobreexpresión de genes tóxicos per se o cuya sobreexpresión reduzca la viabilidad del animal (Drago et al., 1998; Forlino et al., 1999; Wakita et al., 1998). Con este fin se empleó por primera vez en 1992 (Lakso et al., 1992), donde se describe la activación, mediada por Cre, del gen tumorigénico SV40T; en este caso la especificidad de tejido la determinó el uso de un promotor específico de tejido para Cre, demostrándose que la recombinación ocasionaba la expresión del SV40T y que esto provocaba la aparición de tumores de forma inequívoca; también demostraron que la presencia tumoral estaba limitada al tejido de expresión de la recombinasa y que en ausencia de la misma el transgen permanecía completamente quiescente. La expresión génica condicional tiene lugar en la célula que ha sufrido la recombinación y también en su progenie, lo cual se ha aprovechado para realizar análisis de linajes celulares con diversos marcadores (Dymecki et al., 2002; Tsien et al., 1996; Yamauchi et al., 1999).

Se han generado además líneas respondedoras condicionales con dos marcadores, muy útiles en el estudio de procesos patológicos o de desarrollo que implican múltiples etapas. Como ejemplo, en una de ellas las células expresan β -galactosidasa de manera constitutiva hasta la administración de Cre, momento en que se escinde el gen *LacZ* y se permite la expresión condicional de gfp (Novak et al., 2000). Se han desarrollado también líneas murinas que emplean dos genes marcadores de expresión condicional a la expresión de dos recombinasas diferentes: tras una primera ronda de recombinación por parte de FLP se expresa gfp y tras otra ronda de recombinación, esta vez mediada por Cre, se expresa la fosfatasa alcalina (Awatramani et al., 2003).

La generación de modelos de KI condicionales tiene una mayor implantación como complemento a los KO condicionales, en la denominada reparación génica condicional: en ella lo que se logra es el rescate condicional del fenotipo en un animal KO (Nagy, 2000; Rossant and Nagy, 1995). Este método resulta de gran ayuda en la caracterización de los diferentes genes implicados en un linaje celular o una etapa determinada del desarrollo (Matsuda and Aiba, 2004; Nagy et al., 1998) al permitir realizar combinaciones en un mismo animal de dos o más Knockouts y poder revertirlos a elección. También tiene gran

utilidad en la caracterización de las distintas funciones que presenta un mismo gen en diversos tejidos o etapas del desarrollo, puesto que en este caso, el KO presenta a menudo el fenotipo correspondiente a la deficiencia más letal en el animal, enmascarando otros efectos secundarios. En estos modelos, la expresión de la recombinasa específicamente en el tejido o etapa más críticos esa actividad génica, y con ello el fenotipo que producía, permitiendo el estudio en otro momento o línea celular, donde el fenotipo que generaba su deficiencia no era apreciado anteriormente o, incluso en los casos de letalidad temprana, no llegaba a producirse.

Entre las demás recombinasas específicas de secuencia destacamos la integrasa ϕ C31 de *Streptomyces*, la cual también ha sido utilizada en distintos tipos celulares de mamíferos (Andreas et al., 2002; Groth et al., 2000; Thyagarajan et al., 2001). En cuanto a ratón, se tienen en ella puestas grandes expectativas, pues al catalizar exclusivamente reacciones de integración e inversión, es potencialmente muy útil en la generación de *knockin* condicionales (Belteki et al., 2003; Hollis et al., 2003). ϕ C31 ha sido optimizada a nivel de codones de expresión eucariota de modo que ha alcanzado una efectividad en la recombinación semejante a la de Cre (Raymond and Soriano, 2007). Sin embargo, se han visto daños en el ADN tras la recombinación mediada por ϕ C31 (Dafhnis-Calas et al., 2005) y existen numerosos pseudo sitios de reconocimiento a la enzima en el ADN humano que pueden dar lugar a integraciones en sitios no deseados y no esperados (Chalberg et al., 2006).

2.3.1.3. Generación de ratones *Knockout* condicionales

En los KO condicionales de tejido el vector de *targeting* se diseña para que el gen a eliminar, o una parte esencial del mismo, se encuentre flanqueado por las secuencias de reconocimiento de la recombinasa. Dicho gen es modificado por recombinación homóloga en las células ES, llevando dicha modificación a los animales generados a partir de ellas; mediante el cruce de esta línea respondedora con otra que exprese la recombinasa bajo el control de un promotor específico de tejido logramos obtener el ratón deficiente deseado (Kwan, 2002), donde el gen ha sido delecionado en la población celular que expresa la recombinasa, manteniéndose inalterado en el resto de tejidos del organismo.

Esto ofrece una gran versatilidad en el estudio de las funciones génicas, pues puede enfocarse bien al análisis funcional de un gen en distintos tipos celulares (cruzando diversas líneas murinas transgénicas a la recombinasa, que presenten un patrón de expresión diferente, con una misma línea transgénica al sustrato) o bien al análisis funcional de diferentes genes en un mismo tipo celular (cruzando una misma línea transgénica a la recombinasa con múltiples líneas respondedoras).

Esta estrategia fue demostrada por primera vez por Gu y sus colaboradores, los cuales, utilizando la recombinasa Cre, deleccionaron el promotor y el primer exón del gen de la polimerasa β ($\text{pol}\beta$) tras haberlos flanqueado por dos sitios loxP orientados de forma directa (Gu et al., 1994). Estos investigadores restringieron la expresión de Cre a células T, observando que el proceso de recombinación específica de secuencia ocurría exclusivamente en dicha población celular; sin embargo, la eficacia fue sólo de un 40%, lo cual pudo ser debido a la utilización de la proteína Cre original, la cual ha sido posteriormente mejorada con diversas modificaciones (Koresawa et al., 2000; Kozak, 1997; Shimshek et al., 2002; Varshavsky, 1997).

Desde este primer modelo, numerosos genes murinos han sido deleccionados y analizadas sus funciones, empleando para ello tanto Cre como FLP (Agah et al., 1997; Farley et al., 2000; Kwan, 2002; Rajewsky et al., 1996; Rodriguez et al., 2000); en las bases de datos antes mencionadas se encontramos una extensa relación de las líneas murinas respondedoras condicionales existentes.

2.3.2. Modelos condicionales: Expresión y/o actividad inducibles

Además de lograr especificidad a nivel tisular, se han realizado numerosos estudios con

diversos sistemas inducibles de expresión y actividad (Jaisser, 2000) buscando el control del momento de la recombinación específica de secuencia

Para resultar de utilidad, un sistema inducible debe de cumplir ciertos requisitos:

- Debe tener una regulación estricta que no permita un escape detectable.
- El agente inductor debe ser específico a su diana y no ser tóxico.
- La cinética de inducción debe ser rápida y permitir alcanzar niveles de expresión lo suficientemente altos como para producir una respuesta apreciable.
- El proceso de inducción debe ser reversible (idealmente), de modo que permita una monitorización exacta.

Con este propósito se han generado las versiones inducibles de las recombinasas específicas de secuencia y aunque por el momento no cumplen el último requisito (al ser empleadas de forma individual), son ampliamente utilizadas. Como se ha dicho anteriormente, en <http://www.mshri.on.ca/nagy> y otras bases de datos se expone una relación de las líneas murinas inducibles transgénicas a Cre y FLP.

Estos sistemas regulan de forma exógena la expresión (por medio de un control transcripcional) o la actividad (mediante un control postraducciona) de la recombinasa específica de secuencia.

2.3.2.1. Control de la expresión de la recombinasa

Originalmente este tipo de regulación temporal se basaba en el uso de promotores que respondían a un choque térmico o a la adición de iones metálicos pesados o ARN de doble cadena (Yarranton, 1992), todo lo cual podía interferir gravemente con los procesos transcripcionales endógenos. Posteriormente se han ido aprovechando diversos sistemas de control de organismos procariotas (sistemas represores/operadores/inductores de tetraciclina o lac) (Gossen and Bujard, 1992; Labow et al., 1990) o de *Drosophila megalogaster* (sistema del receptor de ecdisona) (No et al., 1996), los cuales, al no interferir con la maquinaria de organismos superiores, han tenido un gran desarrollo y son de amplia utilización en mamíferos. Todos estos sistemas de control se fundamentan en una regulación transcripcional, basada en la introducción de un promotor inducible que controle la expresión de la recombinasa.

El promotor Mx1, inducible por interferón- α/β o pl-pC, fue el primero de estos sistemas en utilizarse *in vivo* y aunque ha sido empleado con éxito en el entorno murino en unión a las recombinasas específicas de secuencia (Li et al., 2011), su uso está limitado a ciertos tipos celulares (hígado, bazo) donde su expresión es significativa y/o el inductor se muestra biodisponible (Kuhn et al., 1995).

El sistema más ampliamente utilizado lo constituye el sistema de la tetraciclina (tet), mediado por la adición del ligando exógeno doxiciclina (Dox) (Saam and Gordon, 1999; Utomo et al., 1999). Este método ha sido utilizado tanto en su versión inicial "tet-OFF" donde un "Tet-controlled transactivator (tTA)" titula al activador en presencia de tet (no activación en presencia de tet) (Kistner et al., 1996), así como en la versión "tet-ON" (rtTA) (activación en presencia de tet) (Schonig et al., 2002; Hasan et al., 2001). Sin embargo hay que destacar que la regulación mediada por este sistema se ve afectada por el lugar de integración de la recombinasa: se han descrito casos en que dicha regulación no existe o es muy leve (Leneuve et al., 2003), probablemente debido al efecto de potenciadores endógenos cercanos al sitio de integración. En relación a esta problemática se ha descrito una cepa transgénica de Cre con un mayor control basal (Schonig et al., 2002).

2.3.2.2. Control de la actividad de la recombinasa

El control postraducciona viene dado por la utilización de proteínas de fusión entre las recombinasas específicas de secuencia y los dominios de unión a ligando (*Ligand Binding*

Domain, LBD) de diversos sistemas hormonales, resultando en la expresión de una proteína híbrida que sólo es activa (y por tanto capaz de traslocar al núcleo y recombinar su sustrato) en presencia de su ligando (Metzger et al., 1995).

Lo que sucede es que una vez sintetizada la proteína de fusión y liberada al citoplasma, en ausencia de ligando, el LBD (y con ello la recombinasa) permanece secuestrado en el citoplasma por proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) (Picard, 1994), mientras que tras la adición del agonista, éste induce determinados cambios conformacionales en el LBD que liberan a la proteína de fusión de su anclaje, permitiendo su traslocación al núcleo y con ello la interacción de la recombinasa con el ADN (Chow et al., 2006; Sauer, 1998).

Esta metodología (ver figura 7) ha sido ampliamente aplicada, fusionando los LBDs del andrógeno (AR), progesterona (PR), glucocorticoides (GR) o estrógeno (ER) tanto a FLP (Angrand et al., 1998; Buchholz et al., 1996; Hunter et al., 2005; Logie and Stewart, 1995; Nichols et al., 1997) como a Cre (Brocard et al., 1997; Dias et al., 1998; Feil et al., 1996; Metzger et al., 1995; Shimshek et al., 2002). Al tratarse de sistemas hormonales presentes en especies superiores, el problema que surgió inicialmente fue la capacidad de respuesta de las proteínas de fusión a los ligandos endógenos, lo que provocaba una recombinación ligando-independiente (Kellendonk et al., 1999; Schwenk et al., 1998); este problema se mostraba aún más acentuado en los experimentos realizados *in vitro* (Cheng et al., 2000; Fuhrmann-Benzakein et al., 2000; Zhang et al., 1996), por lo que para paliarlo se mutaron los LBDs de las diferentes hormonas utilizadas haciéndolos insensibles a los ligandos endógenos pero manteniendo la capacidad de respuesta al análogo sintético. Destacamos un LBD mutado de la progesterona (Cre*PR), que se une específicamente al RU486 (Kellendonk et al., 1999; Wunderlich et al., 2001) y varios LBDs mutados del estrógeno, los cuales responden de forma específica al tamoxifeno (TM) o al 4'OH-tamoxifeno (OHT): el ER^T, primero de estos sistemas insensible al ligando natural estradiol (Li et al., 2000; Metzger and Chambon, 2001; Vooijs et al., 2001), el ERTM, de ratón (Guo et al., 2002; Hayashi and McMahon, 2002) y el ER^{T2}, de humano (Imai et al., 2001; Lizen et al., 2015; Seibler et al., 2003), el cual es 10 veces más activo y por tanto con menos toxicidad asociada que ER^T (Indra et al., 1999). De este modo se ha conseguido que tras una adición breve y controlada del agonista se produzca la reacción de recombinación deseada (Lo Cascio et al., 2014) sin la aparición de los graves efectos indeseables de los comienzos (Danielian et al., 1998). También en el caso de FLP y ϕ C31 se están haciendo avances importantes en este sentido (Hunter et al., 2005; Maetzig et al., 2014; Sharma et al., 2008), aunque no se ha alcanzado el desarrollo obtenido para Cre.

Por otra parte, con el objetivo de conseguir un mayor control en la regulación se desarrolló la proteína de fusión mERCremER (Casanova et al., 2002; Sohal et al., 2001; Tannour-Louet et al., 2002; Zhang et al., 1996), formada por Cre y dos ER-LBDs (murine Estrogen Receptor, mER), uno a cada extremo de la recombinasa. Se demostró que esta doble regulación disminuía el nivel basal de recombinación en ausencia de ligando, sin alterar (aunque no en todos los casos) la eficacia de la recombinasa (Verrou et al., 1999).

En los modelos murinos existentes esta regulación se sitúa en uno de los siguientes entornos: o bien manteniendo una expresión ubicua de la fusión gracias a promotores genéricos fuertes, lo que otorga al sistema un control exclusivamente temporal del mismo, (Guo et al., 2002; Hayashi and McMahon, 2002; Seibler et al., 2003), o bien aprovechando el control adicional que ofrecen los promotores específicos de tejido, restringiendo la expresión de la fusión tanto espacial como temporalmente (Danielian et al., 1998; Kellendonk et al., 1999; Logie and Stewart, 1995; Schwenk et al., 1998; Vasioukhin et al., 1999; Zheng et al., 2002). Dentro de esta última vertiente debemos destacar que se han desarrollado modelos donde un único vector lleva tanto el gen de la recombinasa como sus sitios de reconocimiento, facilitando y acelerando en gran medida la obtención del ratón condicional (Kaczmarczyk and Green, 2001).

Aunque la fusión al ER-LBD es la que mayor expansión ha tenido (Feil et al., 2009), los modelos basados en los LBDs del receptor PR (Kellendonk et al., 1996; Psarras et al., 2004),

GR (Brocard et al., 1998; Dias et al., 1998; Siprashvili and Khavari, 2004) o AR (Kaczmarczyk and Green, 2003), aunque con un desarrollo menor, han conseguido a su vez alcanzar un estricto control espacio-temporal con un bajo fondo y una gran sensibilidad a los respectivos ligandos (Kellendonk et al., 1999; Minamino et al., 2001; Wunderlich et al., 2001; Zhou et al., 2002b).

2.3.3. Modelos condicionales alternativos: otras vías de administración de la recombinasa

En la gran mayoría de los experimentos condicionales existentes, la recombinación se alcanza tras el cruce de la línea respondedora con la línea transgénica a la recombinasa. Sin embargo, un inconveniente en esta estrategia es, salvo ciertas excepciones (Seibler et al., 2003), el gran número de cruces necesarios para el establecimiento de las líneas murinas que conforman el sistema y el cruce entre ellas. Además, en el caso de los modelos inducibles por unión de la recombinasa al LBD de los receptores hormonales, la administración sistémica del ligando dificulta la restricción a un tejido o área pequeña.

Estrategias mucho más rápidas y que consiguen una administración de la enzima controlada espacial y/o temporalmente consisten en la introducción de la enzima (Cre o FLP) mediante transferencia retroviral (explicada más adelante, pues ha sido empleada en esta tesis doctoral) (Eaton et al., 2002; Psarras et al., 2004; Silver and Livingston, 2001), transferencia lentiviral (Maetzig et al., 2014), transferencia adenoviral (Ahmed et al., 2004; Bergo et al., 2004; Nakano et al., 2001; Sorrell et al., 2010; Wang et al., 1996), inyección pronuclear de un vector de expresión de la recombinasa (Araki et al., 1995) o inyección del ARN de la recombinasa (Van den Plas et al., 2003) o la proteína en sí (Jo et al., 2001; Peitz et al., 2002; Will et al., 2002).

La utilización de vectores adenovirales (AdV) o adeno-asociados (AAV) (los cuales son defectivos en la replicación) es el método que más expansión ha tenido: adenovirus que expresan Cre han sido administrados a cultivos celulares murinos (Kanegae et al., 1995; Ueno et al., 2000) o, mediante inyección intravenosa, a ratones respondedores (Stec et al., 1999; Wang et al., 1996). También en el caso de inyección intracardiaca (Agah et al., 1997), intratraqueal (Jackson et al., 2005) y cerebral (Wang et al., 1996) se ha observado recombinación de forma exclusiva en el órgano de administración; ésta es una buena alternativa de alcanzar un control temporal y espacial del proceso de recombinación; sin embargo, hay que tener en cuenta que la permanencia de Cre en el organismo es limitada debido a la respuesta inmunitaria generada y también que es necesario distinguir el fenotipo generado por la recombinación de los efectos debidos a la transducción viral o a la respuesta inmune generada contra ella (Akagi et al., 1997).

2.3.4. Uso combinado de dos recombinasas

La utilización conjunta de dos o más recombinasas amplía enormemente las posibilidades que éstas pueden ofrecer al otorgar una mayor especificidad al proceso, permitir a la vez varias modificaciones en más de un tipo celular o posibilitar el estudio de eventos secuenciales o relacionados al introducir más de una modificación en el mismo animal (Young et al., 2011).

La combinación de Cre y FLP ha sido usada en diversos experimentos de generación de *knockout* condicionales para eliminar selectivamente el gen marcador de resistencia de la línea respondedora (Meyers et al., 1998; Ren et al., 2002). En estos experimentos el gen a delecionar es flanqueado por sitios loxP, mientras que el casete de selección lo es por sitios FRT. De este modo, con la adición de FLP se puede eliminar el gen de selección, de manera que no interfiera en la fisiología celular, manteniendo la propiedad de condicionalidad del gen elegido. Lo mismo se ha conseguido utilizando las recombinasas ϕ C31 y Cre (Yu et al., 2013). Esta metodología evita la dificultad estadística que presenta, con el mismo objetivo, la introducción de tres LoxP en el vector de *gene targeting* (Karttinen and Nagy, 2001).

Diversos grupos de investigación han desarrollado varios métodos de seguimiento *in vivo* de la recombinación, utilizando para ello dos marcadores diferentes de expresión condicional a la recombinación, situados en la misma línea respondedora. Como enzimas se han empleado Cre y FLP, las cuales son introducidas bien por medio de dos vectores de expresión, generalmente virales, o bien estableciendo dos líneas transgénicas, cada una expresando una recombinasa. En un modelo experimental, el gen de la EYFP se encuentra flanqueado por loxP y el de la ECFP por FRT (Frank et al., 2003); el animal respondedor expresa ambos marcadores de forma ubicua y tras la administración de Cre o/y FLP deja de expresar uno de ellos, el otro o los dos, permitiendo el seguimiento y caracterización del proceso de recombinación *in vivo*. En otro trabajo (Awatramani et al., 2003) lo que se consigue es la activación de los dos genes marcadores, la gfp y la fosfatasa alcalina, tras darse de forma secuencial el proceso de recombinación mediado por FLP y Cre. Yamamoto y col. (Yamamoto et al., 2009), por su parte, generan una línea respondedora que contiene floxeado el gen de resistencia a neomicina, después el gen LacZ flanqueado por dos sitios FRT al final el gen de la Egfp; la expresión de Cre permitirá la expresión ubicua de β -galactosidasa y, de forma condicional a la expresión de FLP, la de Egfp; la expresión primero de FLP genera un ratón de expresión condicional de Egfp tras la expresión de Cre (Yamamoto et al., 2009).

Otro grupo ha empleado con éxito tres recombinasas en un mismo experimento: ϕ C31, Cre/LoxP y Dre/Rox (Yu et al., 2014). Este estudio aprovecha la presencia de un sitio pseudo attP en el genoma bovino para integrar un fragmento de ADN que contiene dos sitios Rox flanqueando el gen de la gfp, dos sitios LoxP flanqueando el gen de resistencia a neomicina y entre ambas parejas de sitios de reconocimiento el gen de la luciferasa (el cual debería permanecer activo en el genoma tanto antes como después de la recombinación). Tras la transducción simultánea de Cre y Dre, demuestran la efectividad de la recombinación midiendo la desaparición de gfp y verificando por PCR la aparición de los productos de la recombinación específica de secuencia. Por otra parte la expresión de la luciferasa no se ve alterada por la recombinación.

La utilización conjunta de dos recombinasas específicas de secuencia ha permitido también el proceso dual de intercambio de casete mediado por recombinación (*dual Recombinase Mediated Cassette Exchange*, dRMCE), el cual permite una integración génica localizada, así como la generación de diversas combinaciones de expresión génica condicional. Como ejemplos tenemos la utilización conjunta de Cre y FLP (Anderson et al., 2012; Lauth et al., 2002; Schebelle et al., 2010), Cre y ϕ C31 (Dafhnis-Calas et al., 2005), Cre y R (Nanto and Ebinuma, 2008), o FLP e Int HK022 (Voziyanova et al., 2013). También el EUCOMM se ha aprovechado del empleo en un mismo experimento de dos recombinasas (Cre y FLP) y ha establecido un método de *conditional gene trapping* (Schnutgen et al., 2006). Por último destacar que la utilización conjunta de Cre y FLP permite también la modificación condicional simultánea en dos regiones de un mismo gen (Testa et al., 2003); empleando la técnica de *Recombineering* (Recombination-mediated genetic engineering) (Copeland et al., 2001) se genera un vector de targeting que es capaz de introducir dos fragmentos génicos, uno flanqueado por loxP y el otro por FRT. De este modo, tras la recombinación selectiva es posible obtener tres combinaciones genómicas diferentes, con sus fenotipos respectivos, posibilitando un estudio del gen muy detallado (*knockout* convencional, *knockout* condicional o alelo con *gene trap*) (Friedel et al., 2007); este método también lo utilizan el EUCOMM y el KOMP en sus modificaciones condicionales.

Estas nuevas metodologías permiten la reutilización de las líneas murinas condicionales generadas durante estas dos últimas décadas, aumentando muchísimo su potencial (Osterwalder et al., 2010) pues logran integrar nuevos fragmentos o modificaciones génicas sin introducir ADN del vector que los porta.

2.3.5. Cre y FLP: Estudio comparativo y mejoras realizadas

El desarrollo de las recombinasas específicas de secuencia ha venido dictado en gran medida por los problemas asociados que han encontrado las diferentes aproximaciones

experimentales realizadas. Se han modificado, con diferentes objetivos, tanto los sitios de reconocimiento como las propias recombinasas, en sus propiedades catalíticas, su especificidad y su eficacia; también se han generado diversas fusiones a marcadores y otras proteínas, las cuales han aportado nuevas propiedades a las recombinasas; todas estas modificaciones, detalladas a continuación, dotan a estas enzimas de una gran utilidad en la manipulación del genoma eucariota (Birling et al., 2009; Feil, 2007; Garcia-Otin and Guillou, 2006; Kolb, 2002; Sorrell and Kolb, 2005).

La aparición de mosaicismo en el animal, debido a una escisión incompleta del gen a eliminar, constituye el problema más generalizado entre las líneas murinas de *knockout* condicionales (Nagy, 2000; Vooijs et al., 2001). Aunque en ocasiones se pretende que ocurra esto (Betz et al., 1996; Rossant and Spence, 1998; Van Dyke and Jacks, 2002), en general es un efecto indeseable, pues la población celular que no ha sufrido deleción puede interferir o enmascarar el fenotipo buscado y dificultar o impedir una interpretación precisa del mismo.

Por otra parte, la falta de un promotor específico conlleva a menudo un deficiente control de la reacción, permitiendo que haya recombinación en tipos celulares distintos al deseado (Dobie et al., 1997). Además se ha demostrado que la eficacia de la recombinación mediada por Cre también depende del entorno genómico de los sitios de reconocimiento y del tamaño y secuencia del segmento que se pretende delecionar, por lo que el porcentaje de deleción del gen floxeado no siempre se puede predecir con exactitud (Vooijs et al., 2001). Por último, también se ha observado con Cre que la recombinación puede darse en estado embrionario o fetal pero inhibirse en estado adulto (Kellendonk et al., 1999) o en un momento determinado, debido a procesos de metilación del ADN (Rassoulzadegan et al., 2002). Con todo esto podemos decir que una misma línea transgénica de Cre recombina diferentes locus siguiendo una pauta diferente según su accesibilidad, de modo que cada patrón de recombinación obtenido debe ser tomado en consideración de forma independiente.

Aunque existen numerosas publicaciones que utilizan con éxito el sistema de recombinación Cre/loxP, lo que indica que no es lesiva, otros trabajos afirman que Cre, expresada por un largo tiempo o a niveles altos, es potencialmente tóxica en plantas (Coppoolse et al., 2003) o animales (He et al., 2014; Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007), donde es capaz de recombinar secuencias pseudo-loxP existentes en el genoma (Pugach et al., 2015; Thyagarajan et al., 2000); esto puede desembocar en aberraciones cromosómicas y alteraciones fisiológicas (Higashi et al., 2009; Schmidt et al., 2000). Además, una alta expresión de Cre *in vivo* rompe la direccionalidad de la reacción, impuesta por la asimetría de los loxP (Aranda et al., 2001), con lo que se impone la necesidad de mantener un estricto control del nivel de expresión de Cre (Baba et al., 2005).

Por otra parte, hay autores que han observado, asociado a la acumulación de Cre en la fase G2/M del ciclo celular, un retraso en la proliferación por parada del ciclo celular, así como un incremento en la apoptosis, reorganizaciones cromosómicas y la aparición de micronúcleos (Janbandhu et al., 2014; Loonstra et al., 2001; Pfeifer et al., 2001; Silver and Livingston, 2001). Incluso si esas recombinaciones ocurren en un bajo porcentaje, el hecho de que se produzcan depende de la concentración intracelular de Cre y de la duración de su expresión. Los vectores autoinactivantes de Cre minimizan este problema, pues la propia recombinasa está presente en el vector (de diferentes maneras) de modo que o su integración por recombinación homóloga la deja no integrada (al usarse como casete de selección negativa) (Bouabe et al., 2012), o su expresión tras su integración provoca su propia escisión y eliminación (Pfeifer et al., 2001; Silver and Livingston, 2001; Wang et al., 2011). Todo esto indica que Cre, al menos en los formatos actuales, puede no ser la recombinasa óptima para ciertos propósitos.

La recombinasa ϕ C31 también se ha comprobado que posee pseudo sitios de reconocimiento (pseudo-attP) tanto en el genoma murino como humano, confirmándose aberraciones cromosómicas y deleciones derivadas (Chalberg et al., 2006; Thyagarajan et al., 2001). Respecto a FLP, se han logrado modificar los sitios FRT, ampliándolos, de modo

que teniendo una longitud mayor no encontremos secuencias pseudo-FRT en eucariotas que se combinen con ellos, incrementando así la seguridad en el empleo de FLP (Turan et al., 2010).

La existencia de los pseudo sitios de reconocimiento de las recombinasas específicas de secuencia en el genoma murino y humano es un verdadero inconveniente para los experimentos de manipulación génica en investigación, pero curiosamente se ha visto que es muy útil y puede aprovecharse en los estudios de ingeniería de genomas o en la generación de modelos de terapia génica empleándolos como sitios de inserción del ADN exógeno (Calos, 2006; Shultz et al., 2011). Actualmente se dispone de un buscador web que identifica secuencias pseudo-loxP (SeLOX, <http://selox.mpi-cbg.de/cgi-bin/selox/index>) (Surendranath et al., 2010) y pseudo-FRT (Shultz et al., 2011) en el genoma de mamíferos, de modo que ayude al investigador en estos proyectos.

Respecto a la eficacia de la reacción de recombinación, vemos que en los primeros modelos murinos condicionales dicha eficiencia no era en absoluto satisfactoria, por lo que para optimizar su utilización en ratón se han realizado modificaciones sobre las propiedades enzimáticas de las propias recombinasas, generando nuevas variantes de las mismas. Por ejemplo, se ha modificado la secuencia de FLP, la cual tenía su pico de máxima actividad a 30°C (y solo una pequeña fracción a 37°C) (Buchholz et al., 1996), para incrementar su termoestabilidad (Buchholz et al., 1998). Esta nueva proteína, FLPe, muestra un incremento de actividad en cultivo celular de ~4 veces respecto a la original, pero aunque resulta funcional *in vivo* (Awatramani et al., 2003; Farley et al., 2000) únicamente alcanza el ~10-20% de la actividad de Cre (Andreas et al., 2002; Dymecki, 1996; Dymecki and Tomaszewicz, 1998; Rodríguez et al., 2000). Por otra parte, otra variante de la FLP, la FLP-L, posee ~5 veces menos actividad que la original (Buchholz et al., 1996). El rango entre FLP-L, FLP y FLPe es de unas 10 veces, lo cual puede ser aprovechado para estudios de "Fate Mapping", donde lo que se busca es un rango de resolución (Feil, 2007).

La ingeniería de proteínas ha permitido disponer de una segunda generación de recombinasas con nuevas propiedades (Gaj et al., 2014). Para maximizar la actividad de Cre y FLP, ciertos codones de su secuencia han sido modificados, resultando en unas proteínas más eficaces *in vivo* (Buchholz et al., 1998; Koresawa et al., 2000; Rodríguez et al., 2000), entre las que destacamos iCre, de óptima expresión en mamíferos (Shimshak et al., 2002) (con ~1'6 y ~1'8 veces mayor expresión y actividad respectivamente que la Cre convencional) y FLPo, que da unos niveles de eficacia de recombinación similares a los obtenidos con Cre (Raymond and Soriano, 2007). Otras modificaciones de las enzimas incluyen la variación de la especificidad de secuencia (Buchholz and Stewart, 2001; Hartung and Kisters-Woike, 1998; Ringrose et al., 1998; Santoro and Schultz, 2002; Vozyanov et al., 2003), la generación de fusiones de dos fragmentos inactivos de la enzima para provocar de forma controlada su activación (Casanova et al., 2003; Shaikh and Sadowski, 2000) y nuevas enzimas permeables a membranas celulares (Jo et al., 2001; Joshi et al., 2002; Peitz et al., 2002; Will et al., 2002) o fusionadas a una señal de localización nuclear (NLS) para Cre (Baba et al., 2005), FLP (Raymond and Soriano, 2007) o ϕ C31 (Andreas et al., 2002), donde se consigue el control temporal sin necesidad de generar una línea transgénica a la enzima, pero donde el control espacial es más difícil de conseguir.

En la búsqueda de modificaciones más complejas del genoma que permitiesen un análisis más completo del mismo, surgió el proceso de intercambio de casete mediado por recombinación (*Recombinase Mediated Cassette Exchange-RMCE*) (Schlake and Bode, 1994; Turan et al., 2014), el cual, mediante una recombinasa específica de secuencia (o dos en el caso del dRMCE), intercambia un casete flanqueado por dos sitios de reconocimiento incompatibles entre sí por otro casete flanqueado por la misma pareja de sitios de reconocimiento. Es un proceso secuencial que aprovecha dos reacciones básicas de las recombinasas: en un primer paso se da una integración por recombinación de uno de los pares de sitios idénticos y en un segundo paso se da la resolución por recombinación del otro par, quedando integrado el casete y perdiéndose el resto de secuencias (no deseadas) del vector.

Con este método se pueden conseguir, sin introducir ADN exógeno que interfiera, desde mutaciones puntuales a grandes modificaciones génicas, tanto de forma puntual como repetidas tantas veces como se desee. Para conseguirlo necesitamos, como hemos visto, que el casete esté flanqueado por dos sitios incompatibles entre ellos para que la integración sea irreversible, pues si no recombinarían entre sí dando inversión o resolución del fragmento que flanquean. Esto es así porque la reacción de resolución mediada por Cre y FLP es muchísimo más favorable, lo que la hace prácticamente irreversible; sin embargo, por eso mismo, las reacciones de inversión e integración dan lugar a unos productos de reacción susceptibles de recombinar de nuevo entre sí. Esto ha hecho que los casos de integraciones e inversiones condicionales no estén tan expandidos como los de delección.

Con el objetivo de hacer irreversibles estas reacciones se han modificado los sitios de reconocimiento de las enzimas, pues se ha visto que pequeñas variaciones de los mismos, tanto en la secuencia espaciadora como en los fragmentos invertidos, permiten que nuevas combinaciones entre ellos sean reconocibles por la enzima. De este modo se ha conseguido la tan ansiada irreversibilidad en las reacciones de inversión e integración catalizadas por Cre (Araki et al., 1997; Langer et al., 2002; Lee and Saito, 1998; Zhang and Lutz, 2002) y FLP (Schlake and Bode, 1994; Senecoff et al., 1988; Turan et al., 2014; Voziyanov et al., 2003) y, aunque su utilización ha facilitado tanto el proceso de RMCE (Schlake and Bode, 1994; Turan et al., 2014) como la estrategia de inversión FLE_x (Schnutgen et al., 2003), su implantación está aún lejos de ser generalizada, pues la eficacia de recombinación no es tan alta como con los sitios de reconocimiento originales (Araki et al., 2010); además ciertas combinaciones de loxP pueden llegar a recombinar entre sí o con los originales (Kolb, 2001; Lee and Saito, 1998). Como alternativa, como hemos visto en el punto anterior, la utilización conjunta de dos o más recombinasas específicas de secuencia resuelve este problema e incrementa la eficacia del sistema (Lauth et al., 2002).

2.3.6. La especificidad de la secuencia diana y los modelos de recombinación específica de secuencia (RES). *Gene editing*

La ingeniería genómica (*Gene Editing*) se ha convertido en una realidad en los últimos años. La técnica consigue insertar, reemplazar o eliminar un segmento de ADN del genoma, mediante el uso de nucleasas modificadas (ingenierizadas) o "tijeras moleculares" (Prieto et al., 2012). Las nucleasas crean roturas de doble banda (DSBs; *double-stranded breaks*) en sitios (*targets*) definidos mediante oligonucleótidos que actúan de cebador. Estas roturas serán reparadas mediante recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ), que fijarán las modificaciones (Meissner et al., 2014).

En la actualidad se han desarrollado cuatro familias de nucleasas: Nucleasas de dedos de Zinc, (*Zinc finger nucleases*, ZFNs), nucleasas efectoras tipo activador transcripcional (TAL Effector Nuclease, TALENs), el sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated genes*) y las meganucleasas. Esta tecnología, sin estar exenta de problemática, ha revolucionado el análisis genómico funcional porque ha simplificado y acelerado en gran medida la manipulación necesaria para obtener una modificación de *knockout* y porque es aplicable a la mayoría de las especies (Meissner et al., 2014). El sistema de más reciente desarrollo es el CRISPR/Cas, que parece presentar ciertas ventajas sobre los anteriores: La especificidad de secuencia, que radica en el complejo ribonucleotídico diseñado (Cas protein:sgRNA) (sdRNA, *single guide RNA*) y no en el reconocimiento proteína/ADN; la alta eficiencia catalítica y la capacidad de introducción simultánea de múltiples mutaciones en diferentes locus.

Sin embargo todavía existen efectos indeseados (*Off-target effects*) que tienen que ser mejorados; principalmente encontramos la generación de alelos múltiples, como consecuencia de la promiscuidad del mecanismo de reparación NHEJ, y la introducción de mutaciones en otros *loci* con cierta homología de secuencia; esto, en muchos casos, es difícil de evaluar.

La combinación del proceso de recombinación específica de secuencia (RES) con la nueva multi-especificidad aportada por estas nucleasas está permitiendo la constitución de las proteínas quiméricas TALERS (TALE Recombinasas) y ZFRs (ZFRcombinasas). Esta tecnología se encuentra en su infancia, pero promete convertirse en una herramienta con gran potencial, versatilidad y resolución (Mercer et al., 2012; Nandy et al., 2015; Nomura et al., 2012; Wallen et al., 2015; Zuris et al., 2015).

3. LA β RECOMBINASA (β -rec)

3.1. Origen y características generales

El estudio de la β -rec comenzó hace más de veinte años (Ceglowski et al., 1993a). La β -rec está codificada por el marco abierto de lectura (*open reading frame*, orf) β del plásmido de bajo número de copias pSM19035, perteneciente a la familia inc18 y aislado originalmente de *Streptococcus pyogenes* (aunque confirmado posteriormente en numerosas bacterias del tipo Gram-positivo, como *Bacillus subtilis* (Ceglowski et al., 1993a)).

La amplia distribución de pSM19035 y su gran estabilidad en *B. subtilis*, mucho mayor de la esperada, apuntaban a una mejor replicación y segregación del plásmido de las que teóricamente se le podían atribuir (Rojo and Alonso, 1994). El plásmido pSM19035 consiste en dos repeticiones idénticas e invertidas que comprenden el 80% del genoma. Cada repetición realiza todas las funciones necesarias para el mantenimiento del mismo (Fig. 4). Dado que se sabía que seguía un modelo de replicación unidireccional tipo theta y que poseía dos orígenes (ori) de replicación, uno en cada repetición (Ceglowski et al., 1993b; Ceglowski et al., 1993c), era lógico pensar que dicha replicación solo podía darse si una de las dos repeticiones se invertía, de modo que las horquillas de replicación no colisionasen. Esto era lo que ocurría en el modelo de replicación de Futcher (Futcher, 1986) para el plásmido de 2 μ m (este plásmido codifica la Rec FLP, la cual invertía una de las horquillas de replicación, permitiendo la replicación y la generación de formas multiméricas del plásmido. De este modo la existencia de una recombinasa en el pSM19035 resolvería el problema de replicación que presentaba *a priori* este plásmido.

El pSM19035 posee 13 orfs en cada repetición. En primer lugar se determinó que el orf β codificaba para una proteína de gran homología (28 al 34%) con otras recombinasas específicas de secuencia del grupo de las resolvasas e invertasas y más específicamente (91%) con las recombinasas ResIP y Res β (Bruand et al., 1991), codificadas por los plásmidos de *Streptococcus* sp. PAM β 1 y pIP501, de la familia inc18 (Alonso et al., 1996; Leschziner et al., 1995; Sherratt et al., 1995; Summers et al., 1985). Se confirmó finalmente la existencia de la recombinasa β , la cual no sólo aseguraba la correcta replicación del plásmido que la portaba (Alonso et al., 1996), sino que además maximizaba su segregación entre la población celular al catalizar la resolución en monómeros de las formas multiméricas del

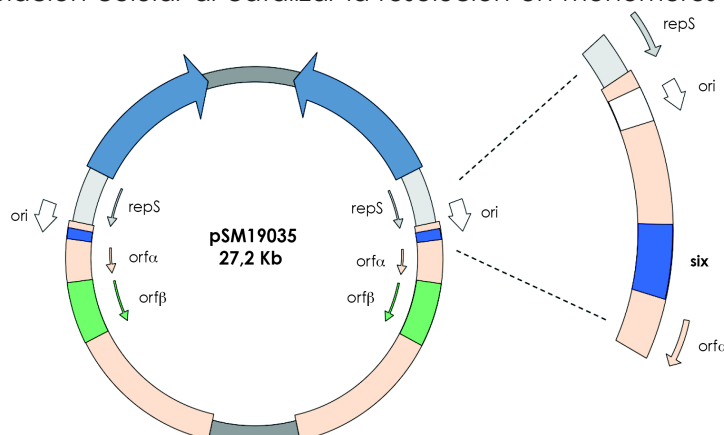


Figura 4. Estructura del plásmido de origen de la β -rec, el pSM19035.

Se indican los dos orígenes de replicación (ori), así como la posición de uno de los sitios six y de los dos orf β , que codifican para la β -rec.

mismo (Rojo and Alonso, 1994).

Posteriormente se buscaron sus potenciales sitios de reconocimiento, puesto que se sabía que estas proteínas reconocían de manera exclusiva unas determinadas secuencias génicas; estos sitios, secuencias asimétricas de 90pb, se identificaron y fueron denominados sitios *six* (*site of crossing over*) (Rojo and Alonso, 1994).

Tras la purificación de la β -rec (Rojo et al., 1993), ésta resultó ser un polipéptido compuesto por 205 residuos de aminoácidos (23,841 Daltons). Migraba en un gel SDS-PAGE como una proteína de 25 kDa que permanecía en solución en forma dimérica (Rojo et al., 1993). Con el objetivo de una mayor comprensión de su mecanismo de acción se procedió a su cristalización, obteniéndose cristales individuales de dicha proteína utilizando la técnica de difusión de vapor con sulfato amónico como agente precipitante; sin embargo, la β -rec sufrió proteólisis durante el proceso de cristalización y únicamente se dispone del extremo amino terminal de la misma (aproximadamente el 60% de la masa molecular total) (Orth et al., 1999).

Se ha demostrado su actividad recombinasa *in vitro*, verificándose que los sitios *six* constituyen su sustrato de recombinación y determinándose que éstos son reconocidos por la β -rec en cualquiera de sus orientaciones mientras se encuentren en la misma molécula de ADN (reacciones intramoleculares) (Rojo and Alonso, 1994); esto define en gran medida el tipo de reacción de recombinación que tiene lugar (Fig. 5):

A - Si los dos sitios *six* tienen la misma orientación (sitios *six* directos), la β -rec deleciona el fragmento situado entre ellos (Rojo and Alonso, 1994).

B - Si tienen orientación inversa (sitios *six* inversos) la recombinasa es capaz de catalizar la inversión o la deleción del fragmento de ADN; en este caso el tipo de reacción que tendrá lugar vendrá determinado por la concentración del cofactor de reacción así como por el grado de superenrollamiento del ADN, como se verá más adelante (Canosa et al., 2003; Canosa et al., 1998; Rojo and Alonso, 1994).

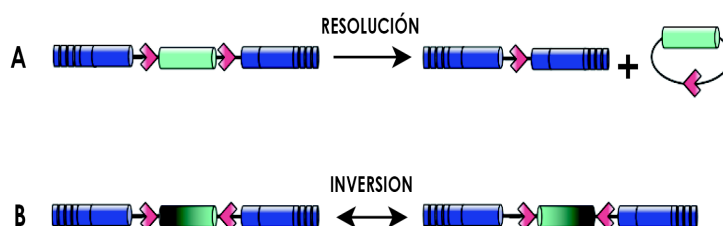


Figura 5. Reacciones catalizadas por la β -rec. A) Reacción de resolución. B) Reacción de inversión. La β recombinasa no es capaz de catalizar la reacción de integración.

Cada sitio *six* consiste en una secuencia de 90pb que engloba dos subsitios adyacentes I y II (Rojo and Alonso, 1995) con diferente secuencia, lo que confiere direccionalidad al sitio *six* (Fig. 6). El subsitio I contiene dos secuencias repetidas e invertidas separadas por una secuencia intermedia asimétrica. Un homodímero de recombinasa se une a cada subsitio y aunque la unión al subsitio I presenta una mayor afinidad (Rojo and Alonso, 1995), es tras la unión a ambos cuando el ADN es reconocido por el cofactor, generándose el complejo sináptico; una vez alineados los dos sitios *six* de forma paralela, la recombinasa se activa y se produce el corte en el dinucleótido central de la secuencia diana GTATAC en el subsitio I, dándose el intercambio simultáneo de las cuatro cadenas (Canosa et al., 1996).

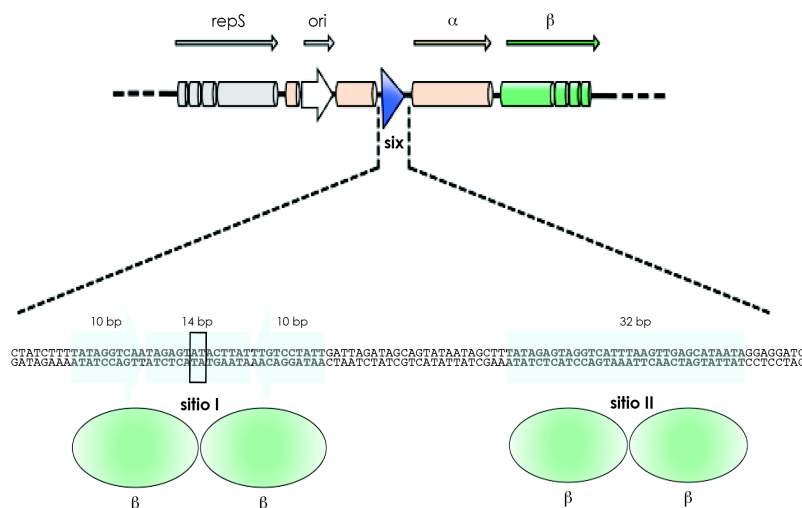


Figura 6. Ampliación del pSM19035 en la región donde se ubican el sitio six y el gen de la β -rec.

Secuencia y estructura del sitio six. En la parte superior de la figura vemos la localización del sitio six y el orf β . En la parte inferior vemos ampliada la secuencia del sitio de reconocimiento six; se especifican los dos subsitios, I y II; el subsitio I contiene dos secuencias repetidas invertidas y un fragmento interno asimétrico de 14 pb; se indica el dinucleótido AT (GTATAC) donde se produce la rotura catalizada por la β -rec. Para que se produzca la reacción de RES, dos dímeros de β -rec se unen al sitio six de forma que un dímero se une a cada uno de los subsitios.

3.2. Caracterización del sistema: estudios en procariotas

3.2.1. Requerimientos de la reacción: presencia de un cofactor y estado del ADN

En los primeros experimentos *in vitro*, llevados a cabo únicamente con el plásmido sustrato y la β -rec purificada, no se logró recombinar el sustrato (Rojo and Alonso, 1994). Puesto que muchas recombinasas requerían un cofactor de reacción, se repitieron los experimentos añadiendo extracto crudo de *B. subtilis*; en este caso sí se obtuvo producto recombinado y, tras determinarse que el cofactor debía tratarse de una proteína de unión al ADN (proteína tipo histona), se identificó la proteína Hbsu, proteína asociada a la cromatina (Oberto et al., 1994) como factor accesorio a la reacción (Rojo and Alonso, 1994).

Posteriormente se han identificado otras proteínas del mismo grupo que, aunque no relacionadas ni estructural ni secuencialmente con Hbsu, pueden reemplazar *in vitro* a Hbsu, aunque con menor eficacia: HMGs de organismos eucariotas, HU de *E. coli*, HU β (subunidad β de HU), HU α (subunidad α de HU), HlpA de *C. phi* e IHF de *E. coli* (Alonso et al., 1995a; Alonso et al., 1995b; Grasser et al., 1997; Ritt et al., 1998). Otras proteínas estudiadas (Fis y H-NS de *E. coli*) han resultado sin embargo incapaces de sustituir a Hbsu en la reacción de recombinación específica de secuencia (Alonso et al., 1995b). Como veremos posteriormente, en el caso de las HMGs no sólo se ha demostrado su funcionalidad *in vitro*, sino también *in vivo* (Stemmer et al., 2002).

Estos resultados apuntaban a la ausencia de un contacto directo entre la recombinasa y su cofactor (Alonso et al., 1995a), lo cual ha sido corroborado por la imposibilidad de detectar complejos β -rec/HMG en los experimentos de entrecruzamiento proteico realizados (Stemmer et al., 2002). Estas proteínas asociadas a la cromatina actúan como factores accesorios en diversas modificaciones génicas en las cuales las enzimas involucradas son insuficientes para generar la estructura del complejo sináptico (Bianchi, 1994; Oberto et al., 1994). Así, el cofactor ejerce su función al unirse a ADNs curvados e inducir una mayor curvatura en los mismos, estabilizando el complejo sináptico (Alonso et

al., 1995a; Alonso et al., 1995b; Segall et al., 1994). El modelo de reacción de estas enzimas implica dos etapas bien diferenciadas: en la primera de ellas la β -rec se une a sus sitios de reconocimiento; en la segunda, el cofactor reconoce la estructura del ADN generada e induce una mayor curvatura del mismo, permitiendo el acercamiento e interacción de los dos sitios *six* y con ello el intercambio de cadenas.

La β -rec, en presencia de una proteína accesoria como Hbsu, demostró ser capaz de catalizar la resolución o la inversión del ADN en sustratos superenrollados que contenían dos sitios *six* orientados de forma directa o inversa, respectivamente. Sin embargo pronto se vieron diferencias, pues mientras que en caso de orientación directa exclusivamente se daba resolución, en caso de orientación inversa la recombinación podía resultar tanto en inversión como en resolución. Por otra parte también se vio que en caso de que el sustrato de reacción estuviese relajado o linearizado la reacción de resolución se inhibía completamente, manteniéndose inalterada la de inversión (Canosa et al., 1998). De este modo, se concluyó que:

- En un sustrato que contenga dos sitios *six* orientados de forma directa, la β -rec catalizará su resolución en caso de un sustrato superenrollado, pero no logrará recombinar de ninguna manera el ADN si éste se encuentra relajado o linearizado (Canosa et al., 1998).

- En un sustrato que contenga dos sitios *six* orientados de forma inversa, la β -rec catalizará exclusivamente la inversión del ADN sobre un sustrato relajado o lineal, mientras que si se trata de ADN superenrollado será capaz de producir tanto su resolución como su inversión. El que ocurra preferentemente uno u otro proceso vendrá determinado en este caso por la concentración relativa de proteína accesoria respecto al ADN sustrato. Esto corrobora el papel del cofactor como estabilizador del complejo de reacción y determina la existencia de dos geometrías diferentes del complejo sináptico, puesto que en el caso de estar presentes de 3 a 13 dímeros de Hbsu por molécula de ADN superenrollado, la conformación que estabiliza el cofactor desencadena preferentemente la resolución del sustrato, mientras que si se encuentran presentes de 15 a 200 dímeros de Hbsu, la geometría del complejo de reacción dará preferentemente los productos derivados de la inversión (Canosa et al., 1998).

3.2.2. Eficacia de la reacción: sistemas de activación génica mediada por recombinación (RAGE)

La β -rec es capaz de catalizar, *in vitro* e *in vivo*, la resolución e inversión del ADN sustrato. Sin embargo, en los primeros estudios la detección del producto recombinado se basaba en la PCR, y era deseable desarrollar métodos más directos de observación. Por otra parte, aunque en la mayoría de los experimentos se contaba con la presencia del cofactor de reacción procariota Hbsu, otras proteínas accesorias, como la eucariota HMG1, también habían demostrado la misma capacidad, aunque exclusivamente *in vitro*.

Con el fin de demostrar que las proteínas del grupo de las HMG eran suficientes para posibilitar *in vivo* la RES mediada por la β -rec, se generó un modelo de estudio empleando una cepa mutante de *B.subtilis* deficiente en Hbsu y un método de detección de RES directo y sencillo (colorimétrico) (Stemmer et al., 2002). La secuenciación del genoma de *B.subtilis* había revelado la presencia de un gen codificante para la proteína Hbsu, pero no fueron identificadas otras proteínas que pudieran sustituirla, como IHF, H-NS, Hha o Fis (Kunst et al., 1997). Posteriormente se ha demostrado que la ausencia de Hbsu compromete la viabilidad de este organismo, lo que confirma la ausencia de los demás productos proteicos mencionados (Fernandez et al., 1997).

En el modelo de estudio de Stemmer, en el cromosoma de la cepa deficiente en Hbsu, se introdujo un fragmento de ADN que contenía dos sitios *six* orientados de forma directa flanqueando el gen *xylE* (el cual codifica la enzima catecol 2,3-oxigenasa, capaz de degradar el pirocatecol en un producto de coloración amarilla). De este modo la detección del proceso de recombinación no se basaba únicamente en pruebas de transcripción génica como la PCR, sino en una reacción colorimétrica (mejor dicho, en su ausencia) por delección proteica en el proceso de recombinación. Con este diseño experimental se

confirmó que la β -rec no era capaz de mediar la reacción de recombinación a menos que se cotransfectase con un plásmido de expresión de HMG1 o Hbsu, donde la tasa de recombinación, tanto por medición colorimétrica como por PCR, resultó ser similar (en un 90% de las colonias no hubo degradación de pirocatecol, comprobándose que era debido a la delección del gen *xylE* por la β -rec). Como vemos, este modelo corrobora la potencialidad *in vivo* de las HMGs en el proceso de recombinación (hecho fundamental, como se verá, en la potencial utilización de este sistema en organismos eucariotas) y constituye el primer modelo de (in)activación génica mediada por recombinación (RAGE) de este sistema.

3.2.3. Utilización conjunta de dos recombinasas: β recombinasa e Int

Como se ha visto (Apartado 2.3.4), existen ya ejemplos de la utilización conjunta de dos recombinasas específicas de secuencia, pero su empleo aún no está generalizado. Sin embargo, es evidente el gran potencial que otorga a la manipulación controlada del genoma, por lo que el desarrollo de este campo empleando la β -rec es, sin duda, uno de los objetivos de nuestro trabajo.

Por raro que parezca, dado el relativamente escaso desarrollo que tiene la β -rec, ya existe un modelo de trabajo empleando en conjunto esta enzima y la integrasa Int (Martin et al., 2000): en este modelo se han aprovechado las características de ambas recombinasas para generar una cepa de *Lactobacillus casei* (muy útil en la fermentación láctea) inmune a la infección por el fago A2 (la cual es letal y por tanto lógicamente interrumpe dicha fermentación). El proceso consta de dos etapas: en la primera se integra la construcción sustrato, que lleva los sitios *six* orientados de forma directa flanqueando el gen de la integrasa Int, un sitio de integración de dicha integrasa en el genoma de *L. casei*, lo que permite su integración en el otro sitio (que está en el genoma bacteriano), y por último el gen del represor del fago A2, *cl*. Una vez integrada la construcción en la bacteria, se introduce por electroporación el plásmido que contiene gen de la β -rec, que al expresarse elimina las secuencias procariotas no deseables en el proceso fermentativo, dejando intacto el represor *cl*. De este modo lo que se obtiene es una cepa de *L. casei* con el gen *cl* del fago A2 integrado de forma estable en su genoma, completamente resistente a la infección por el fago y capaz de fermentar la leche incluso en su presencia.

En este trabajo se corrobora además la capacidad, por parte de organismos procariotas, de aportar un cofactor a la reacción, puesto que en ningún momento se ha adicionado ningún factor conocido y la reacción de recombinación tiene lugar de forma satisfactoria. Este constituye el primer ejemplo de la utilización conjunta de la β -rec e Int.

A pesar de tratarse de un organismo procariota, no hay duda de que afianza nuestras expectativas en cuanto a la utilización de esta enzima en conjunto con otra(s) en un entorno eucariota.

3.3. Estudios previos en el entorno eucariota

Los requerimientos funcionales de esta β -rec, como son la necesidad de un sustrato superenrollado y de un cofactor de la reacción, daban *a priori* a este sistema una probabilidad indeterminada de funcionalidad en el entorno eucariota.

3.3.1. Localización subcelular

Se ha demostrado por microscopía de fluorescencia que la β -rec puede ser expresada de forma estable en diversas líneas celulares eucariotas (Diaz et al., 1999), donde localiza de forma espontánea preferentemente en el compartimento nuclear (Diaz et al., 1999). Estos mismos resultados han sido corroborados mediante *Western Blot* en experimentos de fraccionamiento celular, donde ha sido detectada únicamente en la fracción nuclear. La fusión del extremo carboxilo de la β -rec al extremo amino terminal de la Egfp (β -Egfp)

permitió el análisis *in vivo* de la localización de nuestra proteína. Dado que la Egfp no tiene una localización preferente en la célula, su fusión a la β -rec permitiría a ésta “arrastrarla” a su propia localización. En estos experimentos, la β -rec confirmó tener una localización casi exclusivamente nuclear, mostrando una disposición punteada preferentemente en zonas ricas en heterocromatina (Díaz et al., 1999).

Por otra parte se ha observado también que una sobreexpresión constitutiva de la β -rec, tanto sola como fusionada a la Egfp, no altera ni la morfología ni la fisiología o la tasa de crecimiento celular, permitiendo concluir que la β -rec no da problemas de toxicidad ni afecta a la viabilidad celular. Así mismo, como veremos en los siguientes apartados, se demostró que las dos formas de la β -rec, sola y fusionada a la Egfp, son capaces de catalizar reacciones de recombinación específica de secuencia en células eucariotas tanto sobre sustratos episomales como sobre sustratos integrados en la cromatina (Díaz et al., 1999; Díaz et al., 2001).

La fusión β -Egfp, perfectamente funcional, nos permite suponer que el extremo carboxilo de la enzima es flexible y que su unión a los dominios reguladores de otras proteínas resultará en nuevas proteínas de fusión igualmente funcionales; a este respecto, en el presente trabajo hemos desarrollado un nuevo método más rápido y eficaz de introducción de la fusión β -Egfp mediante vectores retrovirales, así como la construcción de una nueva recombinasa de actividad inducible.

3.3.2. Cofactores de la reacción

Como se ha descrito anteriormente, el cofactor más ampliamente utilizado en los experimentos de recombinación *in vitro* e *in vivo* realizados era la proteína procariota Hbsu. No obstante, otras proteínas procariotas (HU, Hbsu) y eucariotas (HMG1, HMG2) habían demostrado *in vitro* su capacidad para estabilizar el complejo sináptico de la reacción y permitir la obtención de especies recombinadas (Alonso et al., 1995a; Grasser et al., 1997). La necesidad de un cofactor de reacción *in vivo* en diversas líneas celulares eucariotas ha sido analizada, demostrándose que dicho entorno es capaz de proveer a la enzima del cofactor o cofactores necesarios para la reacción (Díaz et al., 1999); más aún, se demostró (Díaz et al., 2001) que las células eucariotas expresan el cofactor o los cofactores de reacción en cantidad suficiente para permitir la reacción, puesto que la sobreexpresión de HMG1 y HMG2 no indujo una mejoría significativa en la tasa de recombinación obtenida ni sobre sustratos episomales ni sobre sustratos integrados en la cromatina.

En el presente trabajo experimental se ha ahondado un poco más en el estudio del cofactor de reacción para determinar la potencialidad del sistema en relación con los de mayor utilización (Cre, FLP).

3.3.3. Estado del ADN: eficacia de la reacción en sustratos episomales e integrados en la cromatina

Los primeros experimentos de recombinación fueron desarrollados realizando cotransfecciones de los plásmidos que portaban tanto la β -rec como el sustrato de reacción; en estos casos, donde el sustrato se encontraba en forma episomal, se pudo detectar producto recombinado por medio de la técnica de PCR.

La incertidumbre surgía en el caso de tratarse de un sustrato integrado en la cromatina eucariota: β -rec necesita de un sustrato superenrollado para que se dé la reacción de delección y, aunque el ADN de las células eucariotas está en efecto superenrollado, su grado de superenrollamiento y organización varía en relación a los organismos procariotas, lo que podía influir negativamente en la reacción de recombinación (Mymryk et al., 1997). El análisis de diversos clones que portaban de forma estable la construcción sustrato reveló que la estructura de la cromatina eucariota permitía la actuación de la β -rec, independientemente del lugar de integración del sustrato, pues mostró la presencia de producto recombinado en todos los clones que se analizaron (Díaz et al., 1999).

3.3.4. β /six en sistemas de activación génica mediada por recombinación (RAGE)

La necesidad de un sistema de detección alternativo era evidente: la PCR no eliminaba completamente la posibilidad de detección de una potencial contaminación de las muestras y por otra parte se buscaba un método sencillo que mostrase la presencia de producto recombinado no sólo analizando el reordenamiento génico, sino detectando la expresión de un producto génico.

Se generó por tanto un sistema (denominado sistema *Recombiner*) de RAGE (Sauer, 1993) en el cual, tras la expresión de la β -rec y consiguiente recombinación del sustrato, se permitía la expresión del gen *LacZ*; los resultados de este modelo experimental han corroborado la funcionalidad de la β -rec en el entorno eucariota, puesto que no sólo se ha detectado un incremento en la actividad β -galactosidasa en caso de tratarse de un sustrato episomal, si no que, en el caso del sustrato integrado en la cromatina celular, el incremento de la actividad β -galactosidasa era igualmente notorio, aunque menor que en el caso anterior.

Estos resultados constituyeron la primera evidencia adicional a la PCR de recombinación *in vivo* en células eucariotas, demostrando a su vez la no interferencia de los sitios six en la expresión de genes adyacentes a su sitio de integración (Díaz et al., 1999; Díaz et al., 2001). Además se determinó que el gen flanqueado por los sitios six tampoco veía alterada su expresión, hecho fundamental en los modelos murinos.

Con el fin de cuantificar el porcentaje de células que, expresando la β -rec, habían sufrido recombinación, es decir, la eficiencia real del proceso, se repitieron los ensayos empleando la fusión β -Egfp como enzima y el *Recombiner* integrado en la cromatina como sustrato. Tras la purificación por FACS de la población celular positiva a la Egfp, ésta se sometió a diversos análisis, dando como resultado que un 80% de la población que expresaba la β -rec había sufrido recombinación (Díaz et al., 2001). Por otra parte también se vio que, aunque la recombinación específica de secuencia conducía efectivamente a la expresión del gen marcador, ésta no alcanza el nivel del control (donde se había transfectado un plásmido de expresión directa de β -galactosidasa). Esto pudo ser debido a una recombinación incompleta, a un menor número de copias génicas presentes en las células, o al intervalo temporal empleado en el ensayo, muy corto para lograr una completa expresión génica.

El presente trabajo ha continuado esta línea de experimentación con el fin de lograr una estimación más exacta de la eficiencia real del sistema y por tanto de su utilidad práctica.

3.3.5. Modelos murinos de aplicación

En el momento de comenzar este trabajo se contaba ya con un modelo murino de aplicación de la β -rec (Fig. 26), formado por dos líneas independientes de ratones transgénicos, una portando el gen de la β -rec (*Tg β*) bajo el promotor *lck* proximal (condicionando su expresión a linfocitos T) y otra llevando una construcción respondedora a la enzima (*Tgrec*), que consistía en dos sitios six flanqueando el gen *XylE*.

Una vez generadas ambas líneas se verificó tanto la presencia íntegra de la construcción sustrato en los ratones respondedores como la expresión restringida a timo y bazo de la β -rec en los animales transgénicos a la misma.

En el análisis por *Southern Blot* (la aproximación experimental utilizada imposibilitaba el empleo de la PCR) de los animales doble transgénicos, no se pudo sin embargo determinar la presencia de producto recombinado en ninguno de los órganos analizados. Como una posible causa era la falta de actividad de la enzima, ésta se determinó en ensayos de recombinación *in vitro*, utilizando para ello extractos de proteínas nativas de timocitos de los animales transgénicos. Este era un abordaje complejo por las dificultades que presentaba, pero pudo determinarse que la β -rec obtenida de timo era perfectamente activa (Servet et al., 2008).

De este modo quedó demostrada la funcionalidad de la β -rec en el entorno murino y, aunque no se pudo detectar producto de recombinación (postulamos que fue debido al método de detección empleado o bien a la construcción sustrato), decidimos realizar en este trabajo dos nuevas aproximaciones que permitiesen, en caso de producirse realmente, mostrar la presencia del producto recombinado.

4. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS

Los receptores de las hormonas esteroideas (estrógeno (ER), progesterona (PR), andrógeno (AR), mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR)) pertenecen a la familia de los receptores nucleares y poseen cinco dominios comunes (Fig. 7):

- Un dominio muy variable amino-terminal (*N-Terminal Domain*, NTD) que afecta a la estabilidad del receptor y a la activación de la transcripción al poseer la Función de Activación 1 (*Activation Function 1*, AF1).
- Un dominio muy conservado de unión al ADN (*DNA Binding Domain*, DBD) tipo “dedo de Zinc”, que interviene en la unión al ADN y a la dimerización del receptor.
- Una región bisagra muy flexible que incluye la señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS).
- Un dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) muy conservado y que además de ser el responsable de la unión al ligando correspondiente contiene también la función de activación 2 (*Activation Function 2*, AF2). También está implicado en la estabilidad y en la dimerización del receptor.
- Un fragmento muy variable y poco conocido en el extremo carboxilo-terminal.

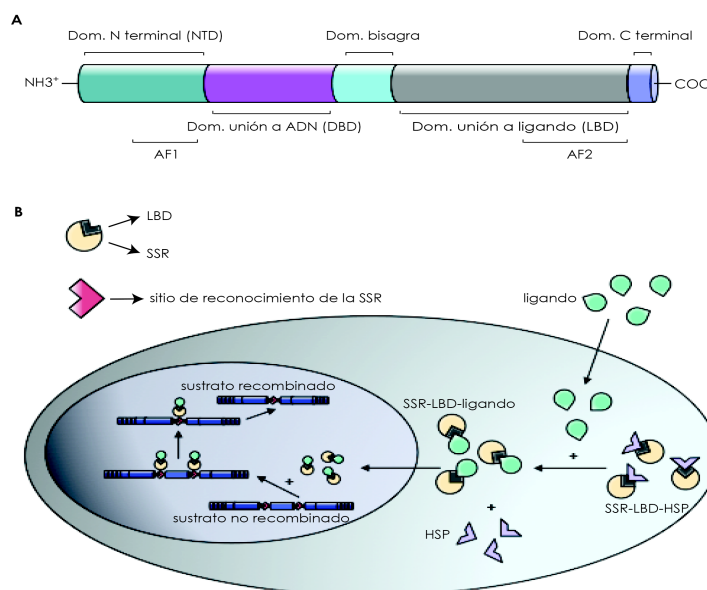


Figura 7. Receptores de hormonas esteroideas: estructura básica y mecanismo de acción en los modelos inducibles de RES. A) Estructura de un receptor de hormona esteroidea. Se detallan los cinco dominios estructurales que los componen: el dominio amino terminal, NTD, que contiene el factor de activación 1 (AF1); el dominio de unión al ADN, DBD, responsable de la unión al ADN y de la dimerización del receptor; la región bisagra, muy flexible y que incluye la señal de localización nuclear (NLS); el dominio de unión al ligando, LBD, responsable de la unión al ligando, de la dimerización del receptor y que incluye el factor de activación 2 (AF2); y el dominio carboxilo terminal, muy variable y poco conocido. **B)** Mecanismo de acción del LBD en los modelos inducibles de RES. La presencia del ligando provoca que se libere el complejo SSR-LBD-HSP (complejo de unión de la proteína de fusión recombinasa-LBD con las proteínas de choque térmico, HSP) y que se forme el complejo SSR-LBD-ligando, que trasloca al núcleo y es capaz de unirse a los sitios de reconocimiento de la recombinasa y catalizar la RES.

El proceso de activación que sufren estos receptores hace que sean denominados factores de transcripción ligando-dependientes. Cuando se adicionan los ligandos (hormonas) correspondientes, éstos se unen a sus receptores induciendo un cambio conformacional en los mismos que provoca su dimerización y activación, permitiendo su traslocación al núcleo celular. Ya en éste se unen a la matriz nuclear (Buttayan et al., 1983) y dan lugar, junto con sus cofactores, a complejos macroproteicos que serán capaces de activar o reprimir la transcripción génica. Estos complejos se encuentran en continua interacción con sus coactivadores o correpresores (Hager et al., 2002), en un equilibrio dinámico de formación y disociación (Nishi et al., 2001).

Estos receptores se dividen, en función de su distribución celular en ausencia de ligando (Kawata, 2001), en tres grandes grupos: los que se localizan principalmente en el núcleo (ER α / β y PR) (King and Greene, 1984; Perrot-Applanat et al., 1985), los que se localizan principalmente en el citoplasma (GR y AR) y los que presentan una distribución mixta (MR). En todos los casos, la adición del ligando correspondiente provoca la completa traslocación del receptor al núcleo celular (Kellendonk et al., 1996). Además se produce un cambio en la distribución, pasando de un patrón homogéneo y difuso (característico de un estado transcripcionalmente inactivo) a otro heterogéneo y en forma de focos, característico de un estado activo (Fejes-Toth et al., 1998; Racz and Barsony, 1999).

Numerosos trabajos han diseñado fusiones de la gfp (y sus variantes) a estos receptores para estudiar *in vivo* la distribución subcelular del receptor (Matsuda et al., 2002; Tyagi et al., 2000), y ésta ha resultado ser mucho más dinámica de lo que se pensaba tanto en ausencia como en presencia del ligando, presentando en algunos casos una movilidad continua entre el núcleo y el citoplasma (Guiochon-Mantel et al., 1991). La estabilidad de estos receptores es muy variable, pues mientras que el AR y la vitamina D son estabilizados tras su unión al ligando (Arbour et al., 1993; Sheflin et al., 2000), en el resto de miembros de esta familia la inducción aumenta su degradación (Dace et al., 2000; Molinari et al., 1999).

La utilidad de emplear conjuntamente los receptores nucleares y las recombinasas específicas de secuencia (REC) radica en el control temporal que se obtiene en la reacción de recombinación, pues lo que se aprovecha de estos receptores es su dominio de unión a ligando, el LBD:

En ausencia de ligando, los LBDs se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein, HSP) que los mantienen anclados al citoplasma. En presencia del ligando estas uniones son desplazadas por la unión del LBD al propio ligando, lo que provoca un cambio conformacional que les libera de su anclaje y les permite traslocar al núcleo. Esta es la propiedad que se busca al fusionar los LBDs a las REC: la proteína de fusión se mantiene inactiva en el citoplasma hasta la adición del ligando, momento en que trasloca al núcleo y encuentra sus sitios de reconocimiento en el ADN. Como hemos visto en la sección 2.3.2 de este trabajo, numerosos grupos han demostrado la capacidad de este sistema para regular la recombinación específica de secuencia provocada por las recombinasas FLP y Cre en fusiones a los LBDs del ER, GR, PR y AR (Brocard et al., 1998; Chiba et al., 2000; Kellendonk et al., 1999; Logie and Stewart, 1995; Metzger and Chambon, 2001; Minamino et al., 2001; Psarras et al., 2004; Vallier et al., 2001). Estos sistemas han demostrado ser funcionales, pero a pesar de ello presentan un escape basal que provoca la recombinación de un pequeño porcentaje de sustrato en ausencia de ligando.

4.1. El receptor de andrógeno (AR)

El AR constituye el factor de transcripción principal que media el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios masculinos tanto en el feto como en la pubertad y estado adulto (masa muscular y ósea, vello corporal y desarrollo e integridad de la próstata) (Matsumoto, 1994). La secuencia del receptor humano de andrógeno (hAR) consta de 919 aa que comprenden los cinco dominios característicos de la familia. También posee los dos subdominios de activación de la transcripción AF1 y AF2 en los dominios NTD y LBD respectivamente, responsables de la formación de los complejos de inicio de transcripción

con los coactivadores, factores de transcripción generales y la ARN polimerasa II (Lee and Lee Kraus, 2001). La unión de estos complejos a los promotores de sus genes diana, responsables últimos de su función, la realiza el AR en forma de homó o heterodímeros, los cuales son generados por enlaces intermoleculares entre los dominios amino y carboxilo terminales (Nemoto et al., 1994; Ochiai et al., 2004).

Este receptor, que en ausencia de un agonista se encuentra principalmente en el citoplasma celular, se activa tras la unión de sus ligandos específicos, los cuales inducen, como se ha descrito anteriormente, un cambio conformacional del receptor que permite su traslocación al núcleo de la célula; es una vez ahí donde es capaz de reconocer, con ayuda de diversos cofactores (SRC-1, TIF2), los promotores génicos que constituyen sus dianas naturales, activando con ello una cascada de respuestas específicas y ligando-dependientes (Kawata, 1995). Los ligandos naturales del AR son la testosterona (T) y la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), a los que se une con gran afinidad. Entre los ligandos no naturales o sintéticos del AR se distinguen dos familias: la de agonistas esteroideos, como la metiltienolona (R1881) y la mibolerona (mib), y la de los agonistas no esteroideos. Como antagonista esteroideo encontramos el acetato de ciproterona (CPA), mientras que dentro de los no esteroideos destacamos la flutamida, hidroxiflutamida y bicalutamida, ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de próstata. El cambio conformacional que adquiere el AR tras la unión del ligando es diferente según se trate de un agonista o un antagonista, permitiendo respectivamente la interacción con coactivadores o con correpresores, lo que determinará su actividad final (Darimont et al., 1998). Numerosas proteínas han demostrado interactuar con el AR, habiendo sido publicada una relación de las mismas en la base de datos de mutaciones del gen del AR (<http://www.mcgill.ca/androgendb>).

4.1.1. Localización subcelular y traslocación

En la localización subcelular del AR intervienen distintos factores:

- La interacción con chaperoninas (las cuales lo mantienen anclado al citoplasma celular en ausencia de ligando).
- La señal de localización nuclear, NLS (la cual induce la traslocación al núcleo en presencia de ligando).
- La unión a sus cofactores y a otros factores de transcripción (que lo mantienen en el núcleo celular).

La determinación de la localización intracelular del receptor de andrógeno (AR) ha sido muy controvertida, pues en los diferentes estudios realizados se han encontrado resultados contradictorios. En ausencia de ligando este receptor se encuentra en el núcleo celular en los tejidos diana de animales no modificados (Husmann et al., 1990; Sar et al., 1990), mientras que en células transfectadas que lo sobreexpresan se ha localizado al receptor en diversos lugares, dependiendo del tipo celular y el medio de cultivo empleado (Poukka et al., 2000): desde exclusivamente en el citoplasma (unido a proteínas de choque térmico como HSP90), hasta sólo en el núcleo, pasando por una distribución intermedia (Jenster et al., 1993; Simental et al., 1991). En presencia del ligando, el AR se disocia de su unión a las chaperoninas y se dimeriza. Tanto en los tejidos diana no modificados como en las líneas celulares transfectadas, el AR trasloca de forma completa al núcleo celular (Jenster et al., 1993; Simental et al., 1991), quedando su forma activa (si el ligando es un agonista) condensada en focos nucleares. En su forma inactiva, en el caso de que el ligando sea un antagonista, mantiene una distribución nuclear difusa y homogénea (Tyagi, 2000 #11637; Tomura, 2001 #11640; Ochiai, 2004 #11638).

Actualmente es comúnmente aceptado el hecho de que, aun preferentemente citoplásmico en ausencia de ligando, la distribución subcelular del AR es dependiente de la línea celular y del medio de cultivo utilizado, así como del método de fijación y las condiciones de permeabilización celular empleadas en su visualización (Akner, 1995 #11618).

4.1.2. Estabilidad del receptor

En ausencia de ligando, el AR se degrada con rapidez mediante ubiquitinación y proteólisis por el proteosoma. En presencia del ligando, éste se une al receptor y lo estabiliza aumentando su vida media 6 veces aproximadamente (Kemppainen et al., 1992).

El mecanismo de estabilización del AR se debe en parte al cambio conformacional que adquiere dicho receptor tras su unión al ligando, quedando menos susceptible de ser degradado por el proteosoma (He et al., 2001). Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que para conseguir la estabilización del receptor es necesaria la interacción entre los dominios amino-terminal (NTD) y carboxilo-terminal de dicho receptor (unión N/C) una vez que éste se encuentra unido al agonista (Steketee et al., 2002). Esta unión N/C no se da en presencia de antagonistas, lo que lo convierte en un requisito para la actividad del receptor *in vivo*. Este hecho ha sido demostrado mediante mutaciones de aminoácidos de los dominios amino y carboxilo terminal, lo que ha conducido a una disminución más o menos severa de la estabilidad y de la capacidad de inducción por parte del ligando (Langley et al., 1995; Zoppi et al., 1993).

Esta interacción N/C, también presente en otros miembros de la familia (Metivier et al., 2001; Tetel et al., 1999), consigue una ralentización de la tasa de disociación del complejo receptor-ligando, evitando la degradación propia del estado disociado del receptor (He et al., 2000). Se ha demostrado también que la interacción N/C es fundamental para la actividad *in vivo* cuando los agonistas se hallan a baja concentración, pero que no es necesaria *in vitro* o *in vivo* en presencia de una alta concentración del agonista (Kemppainen et al., 1999). De este modo, la interacción N/C aumentaría la potencia *in vivo* de la reacción al estabilizar el AR a bajas concentraciones del ligando.

La traslocación al núcleo por sí sola no parece afectar a la estabilidad del receptor puesto que se ha demostrado la existencia de degradación proteica en el núcleo celular (Tsuneoka and Mekada, 1992), así como el mantenimiento de la tasa de degradación en mutantes incapaces de traslocar al núcleo (Zhou et al., 1994).

Por último, también se ha visto que aunque el LBD por sí solo mantiene la capacidad de unión al ligando con una alta afinidad, la tasa de disociación receptor-ligando aumenta de 5 a 7 veces respecto a la obtenida con el AR completo; esto nos indica que en este caso la unión del ligando no estabiliza al receptor truncado como lo hace con el AR completo (Zhou et al., 1995).

4.1.3. Aplicación del dominio de unión a ligando (LBD) del AR a modelos inducibles murinos de recombinación específica de secuencia

Como hemos visto en el apartado 2.3.2. de esta introducción, existen varios modelos de estudio donde las recombinasas específicas de secuencia Cre y FLP han sido fusionadas a diversas formas del AR LBD.

Comenzando por Cre, una versión modificada de la misma, CreM, que contiene en el mismo vector la enzima y los sitios de reconocimiento, ha sido fusionada al LBD nativo del AR, al LBD de una forma mutada del mismo y a una versión truncada sin el LBD (Kaczmarczyk and Green, 2003). Los resultados obtenidos fueron que, mientras la versión truncada no era activa, la versión nativa se activaba con el agonista mibolerona y la mutada tanto con mibolerona como con el antagonista flutamida y otros compuestos. Los niveles basales encontrados en el caso de la fusión con el LBD nativo resultaron además menores que los encontrados en la fusión al LBD del estrógeno (ER). Se cuantificaron los incrementos de actividad recombinasa obtenidos, siendo de 12 veces respecto al basal en el caso del LBD nativo y de 5 veces en el caso del mutado. En este trabajo también se demuestra que la actividad recombinasa puede ser inducida con la adición del ligando en caso de ser administrada en un vector adenoviral.

FLP también ha sido fusionada al LBD del AR (Logie and Stewart, 1995), demostrándose

la regulación de la recombinación en células eucariotas para esta enzima: en experimentos de administración transitoria de la recombinasa vemos que en ausencia de ligando muestra un 1% de su actividad normal, mientras que en presencia del mismo la actividad alcanza hasta un 50% la de la proteína nativa. La proteína de fusión FLP-AR(LBD) también se ha introducido en otros experimentos con células eucariotas en forma de un único transgen que contiene tanto la recombinasa como sus sitios de reconocimiento (Angrand et al., 1998; Buchholz et al., 1996). Su estudio ha revelado un bajo nivel basal en ausencia del ligando y una gran capacidad de inducción, llegando a obtenerse un porcentaje de recombinación superior al 90% en presencia del ligando.

OBJETIVOS

Los objetivos fundamentales de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Desarrollo y validación de un modelo de activación de la expresión génica mediada por recombinación (RAGE; *Recombination Activated Gene Expression*) para el sistema β /six, que permita determinar la eficacia de la β recombinasa en diferentes contextos celulares y evaluar los requerimientos en cuanto a cofactores de la reacción.
2. Desarrollo y estudio de un modelo inducible de recombinación específica de secuencia que comprende la fusión de la β recombinasa al dominio de unión de ligando (LBD) del receptor de andrógeno (AR). Determinación de la tasa de recombinación mediada por la β recombinasa con el fin de desarrollar una nueva herramienta para la manipulación génica en eucariotas.
3. Generación y análisis de dos líneas de ratón modificadas genéticamente que incluyan construcciones sustrato de recombinación de la β recombinasa, atendiendo a dos estrategias: inserción al azar en el genoma murino, con un número variable de copias (Tgrec), o introducción mediante recombinación homóloga en un locus pre-establecido (copia única; KOsix). Tras la obtención de dobles heterocigotos con la línea Tg β , que expresa la β recombinasa de forma muy selectiva en el linaje T, se evaluará la eficiencia y reproducibilidad de la recombinación específica de secuencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Células

1.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en las transformaciones fueron: XL1-Blue (*recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44*[F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) y TOP-10 ONE SHOT™ (F' *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcr-BC θ 80lacΔM15 ΔlacZ74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL endA1 nupG*), la cual es una cepa de alta eficiencia de transformación (C4040-03 Invitrogen).

1.1.2. Líneas celulares y cultivo

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral fueron las siguientes: 293T (nombre original 293tsA1609neo) (DuBridge et al., 1987) derivadas de la línea 293 (Graham et al., 1977). La línea 293T, embrionaria humana de riñón, fue obtenida por transfección con el antígeno T grande del virus de simio SV40. R1 son células madre embrionarias murinas (*Embryonic Stem Cells*, ES) (Nagy et al., 1993), procedentes de la cepa 129Sv. NIH-3T3, procedentes de fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC CRL-1658). Jurkat, procedentes de un linfoma T humano (ATCC TIB-152). Las líneas celulares murinas HMG1wt y HMG1ko (Calogero et al., 1999), fueron cedidas amablemente por el Dr. M. Bianchi (Univ. Vita Salute San Raffaele, Milán, Italia).

Todas las líneas celulares fueron crecidas en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37 °C. Las líneas celulares NIH-3T3, HMG1-wt, HMG1-ko y 293T fueron cultivadas en medio Eagle modificado (DMEM, Life Technologies, Inc.) y suplementado con un 10% de suero fetal bovino descomplementado (FBS, Cultek, Madrid, España), 10U/L penicilina, 10 μg/ml estreptomycin y 2 mM L-glutamina (Merck, Darmstadt, Alemania). El medio de cultivo de la línea 293T contiene además gentamicina 50 μg/ml. En todos los casos las diferentes líneas celulares fueron despegadas del sustrato utilizando tripsina 0,05%, EDTA 0,02% (p/v) tras dos lavados con PBS cuando la metodología lo exigió.

Las células ES son células totipotentes de ratón y son muy sensibles a la diferenciación, por lo que deben ser cultivadas con el máximo cuidado para evitarlo. Crecen en medio DMEM (4,5 g/l glucosa) (Gibco-BRL) suplementado con un 20% de suero fetal bovino descomplementado (FBS, Gibco), penicilina, estreptomycin, β-mercaptoetanol 50 μM, 1% aminoácidos no esenciales (Biowhitaker Europe) y LIF (1X10³ U/ml) (ESGRO™, Chemicon International, Inc.). El LIF mantiene a estas células en estado indiferenciado, a lo cual también contribuye su cultivo sobre una capa de fibroblastos embrionarios (de no más de 5 pases) inactivados; para ello se siembran los fibroblastos sobre placas gelatinizadas (0,1% de gelatina (CASA) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente) y al alcanzar la confluencia se inactivan añadiendo a su medio de crecimiento (DMEM con NEAA, penicilina, estreptomycin, β-mercaptoetanol y FBS al 10%) una disolución de mitomicina C (Sigma) a una concentración final de 10 μg/ml. Se mantiene el medio de inactivación durante 2 h 30 min a 37°C y a continuación se lava 3 veces con PBS. Las células ES crecen formando agrupaciones de células con un origen común (clones) sobre los fibroblastos embrionarios; cuando los clones superan un tamaño de unas 200-500 células comienzan a diferenciar por lo que es necesaria una renovación del medio de cultivo cada 24 h y una vigilancia continua para pasar las células antes de que alcancen ese tamaño.

La línea celular Jurkat, así como los linfocitos extraídos de los ratones en estudio fueron cultivados en medio RPMI 1640 (4,5 g/L glucosa) (Life Technologies, Inc.) suplementado con un 10% de FBS descomplementado, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES y 1 mM piruvato de sodio en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C, manteniéndose a una confluencia entre 1 X 10⁵ y 1 X 10⁶ células/ml.

1.2. Líneas de ratones

Todos los animales de experimentación utilizados en el presente trabajo se mantuvieron en condiciones estándar (aire filtrado HEP, temperatura estable de 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua esterilizadas por irradiación *ad libitum*), controlándose la presencia de patógenos de forma rutinaria (SPF, *specific pathogen free*). Los animales se estabularon en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología. Todos los experimentos, así como el sacrificio de los animales, se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española (Real Decreto 223/88 y Orden Ministerial 13-10-89 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la protección de animales de laboratorio) y la convención europea (ETS-123) sobre la protección de mamíferos vertebrados usados en investigación.

Las líneas utilizadas han sido las siguientes:

- La cepa 129Sv, de la que se derivaron las células ES que serían modificadas en la generación de los animales KO condicionales (KO^{six}). Los animales fundadores poseían un fondo híbrido CD1X129Sv, el cual fue derivando mediante cruces consecutivos a un fondo prácticamente puro (>96%) de animales CD1 que portan la construcción sustrato en homocigosis.

- La línea de ratones transgénicos respondedores (Tgrec) fue generada por microinyección del plásmido pLck-rec3 (2 pl) en los pronúcleos de óvulos fertilizados de hembras de la cepa C57BL/6XCBA/J (las microinyecciones fueron realizadas por el Dr. L. M. Criado, DIO-CNB) y posterior implantación en una hembra pseudopreñada CD1. Las líneas fueron primero establecidas cruzando los animales fundadores (C57BL/6XCBA/J) con ratones C57BL/6 wt y luego mantenidas mediante el cruce de animales positivos para la construcción.

La existencia del transgen integrado fue detectada en todos los casos mediante el análisis por PCR o *Southern Blot* del ADN genómico procedente de colas de ratones de un mes de edad.

1.3. Anticuerpos

- Los anticuerpos utilizados en los ensayos de *Western Blot* (WB) o Inmunofluorescencia (IF) fueron los siguientes:

Anticuerpo	Dilución	Finalidad	Especie	Proveedor	# Catálogo
α -recombinasa β	1:500	WB/IF	Conejo	J.C. Alonso	no aplica
α -AR(LBD)	1:1000	WB/IF	Conejo	Santa Cruz	(C-19, sc-815)
α -gfp	1:3000	WB	Ratón	Clontech	(8362-1)
α - β -galactosidasa	1:1000	IF	Ratón	Promega	(Z-3781)
α - α -Tubulina	1:500	WB	Ratón	Sigma	(T-9026)
α -Histona H1	1:1000	WB	Ratón	Santa Cruz	(AE-4, sc-8030)
α -IgG peroxidasa	1:2000	WB	Conejo	DAKO	(P0448)
α -IgG peroxidasa	1:1000	WB	Ratón	DAKO	(P0447)
α -IgG Alexa 488	1:200	IF	Ratón	Mol. Probes	(A-11029)
α -IgG Cy3	1:400	IF	Conejo	Amersham	(111-166-008)

Todos estos anticuerpos han sido utilizados a las diluciones recomendadas, según la aplicación.

- Anticuerpos empleados en ensayos de citometría: Anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-B220, anti-CD45, anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-TCR $\gamma\delta$. Estos anticuerpos proceden de Pharmingen o Southern Biotechnologies y han sido utilizados en su forma conjugada (variable según el experimento) con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), *spectral red* (SPRD), avidina (AV) y/o biotina (Biot), empleándose a las diluciones recomendadas por el fabricante y el Servicio de Citometría del Departamento de Inmunología y Oncología (DIO).

- Anticuerpos utilizados en la estimulación de linfocitos T en cultivo:

Anti-CD3 ϵ , anticuerpo monoclonal de BD Biosciences PharMingen (553057).

Anti-CD28, anticuerpo monoclonal de BD Biosciences PharMingen (553294).

Tanto el anti-CD3 como el anti-CD28 se emplearon inmovilizados a placa, para lo cual se diluyen en las superficies de cultivo a la concentración final (1 µg/ml) en Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 y se incuban 6 h a 37°C. Pasado ese tiempo se aspira la solución, se lava la superficie una vez con medio RPMI frío y dos veces con PBS y se siembran las células en su medio de crecimiento (RPMI suplementado).

1.4. Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos (procedentes de Isogen o Genotek) utilizados en los diversos clonajes y reacciones de PCR de este trabajo han sido:

TCRb1: 5'-GTA GCA CTG ACA GAA TGG TAA G-3'
 TCRb2g: 5'-GGA GGA TAC TTG TGA AGA GAG-3'
 sixUP: 5'-GCC CAG TTC CGC CCA TTC TC-3'
 sixDO: 5'-CCA GAC CGG CAA CGA AAA TC-3'
 TSH β-5': 5'-TCC TCA AAG ATG CTC ATT AG-3'
 TSH β-3': 5'-GTA ACT CAC TCA TGC AAA GT-3'
 hGH-3: 5'-GCA CAC GCT GAG CTA GGT TCC C-3'
 hGH-4: 5'-CAT AGA CGT TGC TGT CAG AGG C-3'
 LCKp: 5'-GAC TAG CCT TGG CCT GGG CCT C-3'
 BETAs: 5'-GCT AAA ATT GGT TAT GCA C-3'
 BETAs: 5'-CCT CTT TCC CTT GTT TTT-3'
 EF1-α-s: 5'-GCA CTT GAT GTA ATT CTC C-3'
 LUCIF-as: 5'-GTA AGT GAT GTC CAC CTC G-3'
 ScrESAs: 5'-TCC TTT TCC TCC CTG GAA GC-3'
 NEO1: 5'-GGA GAG GCT ATT CGG CTA TG-3'
 beta(RES)-5: 5'-GAG AGA GGA TCC ATG GCT AAA ATT GGT TAT G-3'
 beta(RES)-3: 5'-GTG TGT GAA TTC TTA ACT ATC CCT CTT TCC-3'
 LACUP: 5'-TCG CCT TGC AGC ACA TCC-3'
 LACLO: 5'-GGC GAC CTG CGT TTC ACC-3'
 5'REVERSE-LACZ: 5'-CCC AGA CCG GCA ACG AAA AT-3'
 LacZ-1: 5'-GTG GTG GTT ATG CCG ATC G-3'
 LacZ-2: 5'-TAC CAC AGC GGA TGG TTC GG-3'
 TCRb1as: 5'-GTT TAA ACC TAT GGG ACT CAA GAT CAG CAC-3'
 TCRb2as: 5'-TTA ATT AAC ATC CTA GAA CAT TCC TGT TGG-3'
 TCRb2s: 5'-GGC GCG CCG CTC CCA CAT CAC CGC T-3'
 PUC-NPAs: 5'-TAA CGG CGC GCC ACT AGT TGG ATC CGA ATT CTC TCG AGA
 AGC TTC TCT AGA GTT TAA ACT GGC CGG CCT GCG GCC GCC GG-3'
 PUC-NPs: 5'-CGG CCG CAG GCC GGC CAG TTT AAA CTC TAG AGA AGC TTC
 TCG AGA GAA TTC GGA TCC AAC TAG TGG CGC GCC GTT AAT-3'
 PUC-NFAs: 5'-CCG AAT TCC TAA AGC TTG CGG CCG CTT AAT-3'
 PUC-NFs: 5'-TAA GCG GCC GCA AGC TTT AGG AAT TCG GCC GG-3'
 LTRBS: 5'-CAT CAT GGC CGG CCC AGA GAG TGA ACC CTG ACT GTT-3'
 SECTK: 5'-AAT AAC TCT GGA CTC AAT TGA-3'
 BAR: 5'-CAG AGA TCT ATG CAT GTG TCA CAC ATT GAA GG-3'
 SAR: 5'-CAG CCG CGG ATG CAT GTG TCA CAC ATT GAA GG-3'
 ARNN: 5'-CAG GCG GCC GCA GGC GCC TCA CTG GGT GTG GAA ATA GAT GG-3'
 ARNH: 5'-CAG AAG CTT GCG GCC GCT CAC TGG GTG TGG AAA TAG ATG G-3'

1.5. Plásmidos y vectores

El plásmido pTA-cloning vector PCR 2.1 y el plásmido PCR BLUNT, ambos de Invitrogen se utilizaron para el clonaje y secuenciación de productos de PCR. El plásmido pEGFP-N1 (Clontech) es un vector de expresión en mamíferos que permite fusionar genes al extremo N-terminal de una variante optimizada de la proteína verde fluorescente (Egfp). Los

plásmidos pcDNA3.1/Hygro (otorga resistencia a higromicina), pcDNA3 (provee resistencia a neomicina) y pEF4/Myc-His A (aporta el promotor EF-1 α , de expresión genérica fuerte), de Invitrogen, se emplearon como esqueletos en diversos clonajes.

Los plásmidos pPNT (Tybulewicz et al., 1991) y pGKneobpA (Soriano, 1995) se utilizaron en la generación del vector de *targeting* como fuentes respectivamente del gen de la timidina kinasa (TK) y del gen de resistencia a la neomicina (neo^r) siguiendo al promotor de la glucoquinasa (GK).

El vector pGEM-E-560-R-LNL, cedido por el Dr. Pierre Ferrier (CNRS, Marsella, Francia), aportó los brazos de homología del gen del receptor β de linfocitos T (T-Cell β Receptor, TCR β) empleados en la obtención del mencionado vector de *targeting*.

El vector pAdapt.hrtTA-VP16-AR-IRES-Egfp, cedido por el Dr. Konstantinos Anastassiadis (EMBL, Heidelberg, Alemania), aportó el dominio de unión a ligando (Ligand Binding Domain, LBD) del receptor de andrógeno (Androgen Receptor, AR), necesario en la generación de los modelos inducibles de recombinación.

El plásmido pLck-hGH sirvió de vector parental en la construcción del vector pLck β 8, portador del gen de la β -rec en los ratones transgénicos a la enzima (Tg β) (Diaz, 2000) y del vector pLck-rec3, empleado en la generación de los ratones transgénicos al sustrato de recombinación(Tgrec). El vector pLck β 8, por su parte, sirvió además como molde para la obtención del gen de la β -rec en otras construcciones.

Los plásmidos p β Egfp (conteniendo la fusión β -Egfp), pRECOMBINER (conteniendo el sustrato de recombinación, consistente en dos sitios de reconocimiento, sitios six, flanqueando en orientación directa al gen de resistencia a la puomicina, *upstream* del gen marcador *LacZ*, responsable de la expresión de β -galactosidasa de forma condicional a la recombinación específica de secuencia), pgal (control positivo de expresión de β -galactosidasa, obtenido del pRECOMBINER por recombinación específica de secuencia *in vitro*), pCDNA.CCR5KDEL (conteniendo el casete *ccr5kdel*) y pUC-m (esqueleto modificado derivado del pUC18) también se generaron en el laboratorio (Diaz et al., 2001) y fueron utilizados en diversos clonajes y experimentos en el curso de este trabajo.

Los vectores retrovirales pLZRCMV-IRES-Egfp, pRV, pRVSINloxP (conteniendo el esqueleto básico del virus autoinactivante; *Self INactivating*, SIN) y pRVSINloxPTP-Luc-IRES- Δ NGFR (conteniendo el gen de la luciferasa del pGL3-Basic, de Promega) se habían generado en nuestro laboratorio con anterioridad y se emplearon en distintos abordajes.

1.6. Enzimas de restricción

Todas las enzimas de restricción fueron de New England Biolabs o de Roche.

1.7. Productos químicos generales

Se obtuvieron en general de las casas Sigma, Merck y Panreac.

2. MÉTODOS

2.1. Clonajes

Los clonajes fueron realizados esencialmente como se describe en Sambrook et al, 1989. La purificación de los fragmentos a clonar fue realizada a partir de digestiones de restricción adecuadas o de reacciones de amplificación por PCR. Se separaron en geles de agarosa y se purificaron con el kit de extracción de ADN de geles "Qiaquick" de Qiagen, utilizando el protocolo recomendado. Las ligaciones de los fragmentos en los vectores adecuados se

realizaron a 16°C durante toda la noche utilizando la ligasa de T4 (Roche).

Las imágenes de geles de agarosa fueron digitalizadas utilizando un sistema de vídeo UVP.

2.1.1. Transformaciones en bacterias

En general, las transformaciones de las reacciones de ligado o de plásmidos fueron realizadas con un protocolo estándar de choque térmico a 42°C durante 45 segundos, sobre bacterias competentes generadas según está descrito (Sambrook et al., 1989). Tras 1 h de recuperación a 37°C en medio LB, las células así tratadas fueron extendidas en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado a cada caso. Al día siguiente, fueron aislados clones individuales y crecidos en LB, purificándose los plásmidos de dichos cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial, y utilizando para ello o bien el kit comercial de Qiagen para la preparación de plásmidos en pequeña escala (Minipreps) o bien las columnas de purificación Endo-Free Maxi de Qiagen, según la cantidad de plásmido necesaria, siguiendo en cualquier caso el protocolo suministrado.

2.2. Transfecciones

Las transfecciones fueron realizadas utilizando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad) y cubetas de 0,4 cm (Bio-Rad). En el caso de las electroporaciones en células NIH-3T3 fueron transfectadas 2×10^6 células (a una concentración de 10^7 cels/ml) y 20 µg de ADN plasmídico (pSPS-Luc y pLuc) por condición, con un pulso de 220 V y 960 µF. Inmediatamente después de la electroporación, fracciones de 1/10 de cada transfección fueron sembradas separadamente en DMEM suplementado durante 48 h. Tras este período, se plaquearon las células a una dilución límite del cultivo (asegurando la presencia de una única célula por pocillo) y se crecieron en medio de selección con el antibiótico adecuado.

La selección con antibióticos para la obtención de clones estables fue realizada bien con higromicina (100 µg/ml) o bien con puromicina (2 µg/ml) (Clontech). Los diferentes clones fueron sembrados sucesivamente en superficies de cultivo mayores hasta que hubo suficientes células para el análisis pertinente y para la congelación.

La transfección del pRECOMBINER en las líneas celulares HMG1wt y HMG1ko es en esencia semejante a la anterior, aunque sin la separación clonal.

La electroporación del vector pLck-rec en la línea celular Jurkat se realizó a 260 V y 960 µF, electroporando 8×10^6 células con 20 µg de ADN y comenzando el proceso de selección al antibiótico (puromicina) 24 h después.

La transfección del vector de *targeting* en las células ES se realizó de la siguiente manera: 1×10^7 células ES se electroporan a 250 V y 500 µF con 30 µg del vector de *targeting* (linearizado por su extremo 3' y purificado mediante fenolización). Las células se sembraron a continuación sobre fibroblastos inactivados y 24 h después se inició la selección con G418 (geneticina) a 300 µg/ml y ganciclovir 2 µM. Tras 7 días de selección los clones resistentes se aislaron y cultivaron en presencia exclusivamente de G418 150 µg/ml; cuando alcanzaron confluencia la mitad del cultivo se congeló y la mitad restante se expandió para su análisis.

Las demás electroporaciones en ES se realizaron siguiendo el mismo protocolo, adaptando la cantidad de ADN electroporado (3 µg-30 µg) al número de células de cada ensayo (1×10^6 - 9×10^6).

2.3. Extracción de ADN genómico

Tanto en el caso de líneas celulares como en el de órganos y colas de ratón, el ADN genómico se extrajo empleando el protocolo #8 del método Easy-DNA (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de uso.

El ADN genómico procedente de clones ES fue extraído tal como se ha descrito (Torres, 1998).

El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (Génesis 6, Termo Spectronic), en caso de disponer de una cantidad suficiente, o por fluorometría (DynaQuant 200 Fluorometer, Hoefer Pharmacia Biotech. Inc.), en caso de tratarse de muestras menores o necesitar una exactitud mayor.

2.4. Tratamiento hormonal

Para determinar la funcionalidad de las proteínas inducibles (pLZR β -LBD-IRES-Egfp y pLZR β -Egfp-LBD) se añadió mibolerona (mib, agonista del receptor de andrógeno, AR) (NEN Life Science Products Inc, DuPont Research, Boston, MA (NLP-024)) a una concentración final variable (10^{-6} M - 10^{-8} M) en los cultivos de NIH-3T3 durante su crecimiento exponencial. La mibolerona fue disuelta en etanol absoluto, quedando la concentración de este no superior al 0,01% (v/v). En todos los cultivos se añadió la misma cantidad de etanol, incluidos los controles. Los ensayos de actividad luciferasa se realizaron a las 1 - 6 días de inducción. En el caso de 6 días de inducción el medio de cultivo con el agonista se renovó a las 72 h.

2.5. Detección de actividad β recombinasa *in vitro*

La detección de actividad β -rec en ensayos *in vitro* ha sido descrita previamente (Rojo and Alonso, 1994). Nosotros hemos utilizado 1 μ g de cada sustrato de ADN, β recombinasa purificada 320 nM y Hbsu 100 nM en 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂ y 50 mM NaCl. La reacción se llevo a cabo a 30 °C durante 30 min. Las proteínas fueron inactivadas incubando la reacción a 65°C durante 10 min y el ADN resultante fue purificado con el kit Qiaprep Spin de Qiagen. Posteriormente, las muestras fueron digeridas durante 1 h con las enzimas adecuadas a cada sustrato, de modo que se diferenciase las especies recombinadas de las no recombinadas, y sometidas a separación en geles del 0,7% - 1% de agarosa.

2.6. Detección de productos de recombinación específica de secuencia por PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 9600. Según la pareja de oligonucleótidos elegida y la naturaleza de la muestra a analizar (DNA plasmídico o genómico), fueron determinados los parámetros de temperatura y tiempo de apareamiento, así como el tiempo de los períodos de extensión. A continuación se muestran los diferentes protocolos seguidos en cada caso.

Como sustrato se han empleado en general 50 ng en el caso de ADN genómico y 1-5 pg en el caso de un sustrato episomal (tanto en su análisis como ADN problema como, previamente recombinado *in vitro* y purificado, siendo utilizado como control positivo de la reacción de recombinación específica de secuencia).

- Para la amplificación del gen de la β -rec se utilizaron beta(RES)-3 y beta(RES)-5: 94°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 15 seg, 59°C 30 seg y 72°C 1 min; 72°C 5 min.

- Para la generación del pLZR β -LBD-IRES-Egfp, el LBD se obtuvo con los oligonucleótidos SAR y ARNN: 95°C 2 min, 30 ciclos de 94°C 30 seg, 62°C 30 seg y 72°C 1 min; 72°C 5 min.

- Para la generación del pLZR β -Egfp-LBD, el LBD se obtuvo con los oligonucleótidos BAR y ARNH: 95°C 2 min, 30 ciclos de 94°C 30 seg, 62°C 30 seg y 72°C 1 min; 72°C 5 min.

- Para la generación del vector de targeting psixTCR, el brazo corto (3') del TCR β 2 se amplificó con los oligonucleótidos TCRb2s y TCRb2as y el brazo largo (5') (TCR β 1) con LTCRBS y TCRb1as: 94°C 2 min, 30 ciclos de 94°C 10 seg, 60°C 30 seg y 68°C 2 seg; 68°C 7 seg, en las

condiciones indicadas para el tampón 3.

- Para el genotipado de los ratones transgénicos al sustrato (Tgrec) los oligonucleótidos empleados fueron hGH-3 y hGH-4: 95°C 2 min, 35 ciclos de 95°C 30 seg, 60°C 30 seg y 72°C 30 seg; 72°C 7 min.

- Para el genotipado de los ratones doble transgénicos Tgrec/Tg β empleamos los oligonucleótidos LACUP/LACLO para detectar los animales positivos al sustrato y BETA_{sens}/BETA_{antisens} para detectar los transgénicos a la β -rec. Las muestras se analizaron con una misma reacción de PCR: 95°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 48°C 30 seg y 72°C 2 min; 72°C 7 min.

- Para el análisis de RES tanto en líneas primarias de ratones Tgrec transducidas con β -rec como en los doble transgénicos Tgrec/Tg β , los oligonucleótidos fueron LCKp y LacZ-2: 93°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 15 seg, 57°C 30 seg y 68°C 2 min, 68°C 7 min.

- Para el análisis de RES en células ES KO_{six} transfectadas con la β -rec y ratones doble transgénicos KO_{six}/Tg β se utilizaron TCRb1, NEO1 y TCRb2g: 95°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 57°C 30 seg y 72°C 2 min; 72°C 5 min.

- Para la detección de la RES en linfocitos T KO_{six} transducidos con la β -rec, empleamos los oligonucleótidos TCRb1 y ScrESas: 93°C 2 min, 40 ciclos de 94°C 10 seg, 51°C 30 seg y 68°C 3 min; 68°C 7 min.

- Para la detección de RES del p-sps-Luc se emplearon EF1- α -s y LUCIF-as: 93°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 10 seg, 49°C 30 seg y 68°C 1 min 30 seg; 68°C 7 min.

- Para la detección de RES en el pRECOMBINER utilizamos los oligonucleótidos sixUP y sixDO: 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 30 seg, 60°C 30 seg y 72°C 1 min; 72°C 5 min.

2.6.1. PCR semicuantitativa

La PCR semicuantitativa de detección de productos de recombinación se realizó en las líneas celulares HMG1wt y HMG1ko. Una vez transducidas ambas líneas con sobrenadante viral conteniendo la proteína de fusión β -Egfp y seleccionada la población GFP⁺, fueron transfectadas con el plásmido pRECOMBINER, analizándose a las 24 h de la transfección la presencia del producto de recombinación.

La PCR se realizó siguiendo el protocolo LightCyclerTM (Roche Molecular Biochemicals) y añadiendo SYBR GREEN a la reacción. La amplificación del producto de recombinación se realizó con los oligonucleótidos sixUP y sixDO, empleándose como control interno de la reacción la amplificación obtenida con los oligonucleótidos LacZ-1 y LacZ-2.

La cantidad de producto recombinado fue calculada empleando una curva de estandarización realizada por duplicado con diluciones seriadas (1:10) del plásmido pgal y normalizándose los resultados con la cantidad total de LacZ. Se realizaron tres experimentos de transfección independientes, realizándose al menos cuatro amplificaciones en cada uno de ellos.

2.7. Detección de productos de recombinación homóloga y específica de secuencia por Southern Blot

Las muestras de ADN genómico (10 μ g) fueron diluidos en un volumen adecuado de tampón de restricción a 4°C durante toda la noche. Tras añadir una primera carga de enzimas de restricción (10 U) fueron incubados a la temperatura de digestión de la enzima durante 1 h. Tras ese período fue añadida una segunda carga de enzima (40 U) y la digestión se continuó durante toda la noche. Los fragmentos resultantes fueron separados de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa del 0,7% (p/v). El gel sufre una depurinización parcial por inmersión en HCl 0,25 N durante 15 min y se transfiere mediante vacío a una membrana de nylon cargada positivamente Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) en condiciones

desnaturalizantes (NaOH 0,4 M), en un aparato Vacuum Blotter 785 (Bio-Rad).

Las sondas (25 ng) se marcaron radiactivamente con dCTP³²P (50 μ Ci) siguiendo el protocolo de marcaje Readyprime II (Amershan Biosciences) y eliminándose la sonda no marcada con columnas de cromatografía (Micro BIO-SPIN Chromatography Columns). Previo a la adición de la sonda para la hibridación, las membranas se prehibridaron 1 h a 65 °C en la solución Rapid-Hyb (Amershan Biosciences). A continuación se añadió la sonda (diluida en esta misma solución) y se hibridó durante toda la noche a esa temperatura. Los lavados se realizaron a una concentración de 0,1% SDS en concentraciones descendentes de SSC (2x - 0,05x) y a temperaturas crecientes (nunca mayores de 70 °C).

El *Southern Blot* se reveló con un Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) y fue procesado con los programas Image Quant 1.2 y Adobe Photoshop.

2.8. Ensayo de detección de actividad luciferasa

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y crecidas hasta alcanzar la confluencia. Se lavaron en PBS y se añadieron 250 μ l de reactivo de lisis por pocillo de 35 mm, dejándolo actuar durante 10 min a temperatura ambiente. El lisado celular se centrifugó a 10000 g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante, que contenía las proteínas; estas fueron tratadas con el sistema Luciferase Assay System (Promega Corp., Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad luciferasa fue medida en un luminómetro de placas (Berthold Technologies). Las proteínas totales fueron cuantificadas (Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, IL) para normalizar los resultados obtenidos.

Las gráficas de actividad luciferasa fueron generadas en Microsoft Excel. Las desviaciones típicas de los datos que se presentan en esas gráficas fueron calculadas en el mismo programa.

2.9. Ensayo de detección de actividad β -galactosidasa *in situ*

La tinción β -galactosidasa de células en cultivo fue realizada siguiendo una modificación del protocolo descrito previamente (Sanes et al., 1986). Las células adherentes fueron simplemente lavadas con PBS, mientras que las células no adherentes (en suspensión) fueron además plaqueadas en un portaobjetos mediante la técnica de *cytospin*. Posteriormente eliminamos el exceso de líquido alrededor de la muestra y la rodeamos con el rotulador de parafina (DAKO), fijándolas con una solución de 0,12% glutaraldehído en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Tras realizar varios lavados en PBS, se realiza la tinción en PBS con 5 mM ferricianuro potásico, 5 mM ferrocianuro potásico, 2 mM MgCl₂ y 0,5 mg/ml X-gal a 37 °C durante 2 - 24 h. Tras esta incubación las células fueron lavadas en PBS, montadas en DePeX (Serva) y visualizadas en un microscopio invertido con lámpara de fluorescencia Leitz DMIRB.

2.10. Producción de sobrenadantes retrovirales y transducción

Los vectores retrovirales utilizados en la presente tesis doctoral se construyeron a partir de los esqueletos retrovirales pLZRCMV-IRES-Egfp, pRV y pRVSINloxP (ver Resultados).

El sobrenadante retroviral para cada vector (pLZR- β -IRES-Egfp, pLZR- β -Egfp, pLZR β -LBD-IRES-Egfp y pLZR β -Egfp-LBD) fue producido por células 293T de forma transitoria siguiendo el método descrito previamente (Abad et al., 2002; Yang et al., 1999) tanto en la empresa biotecnológica Genetrix (Madrid, España) como en el laboratorio, alcanzándose en todos los casos un título superior a 10⁷ TU/ml (unidades infectivas por mililitro de sobrenadante viral). Brevemente, 2 x 10⁶ células 293T fueron transfectadas por precipitación con fosfato cálcico con 5 μ g de cada vector retroviral y 5 μ g del vector de expresión de la envuelta ecotrópica (pCL-ECO) (Naviaux et al., 1996) en presencia de cloroquina 25 μ M (Sigma). 8 h después el medio se renueva por DMEM completo y 24 h post-transfección se cambia el

medio de cultivo al medio óptimo de crecimiento de las células diana; 24 h después del cambio de medio los sobrenadantes son recogidos y clarificados por centrifugación (1000 g, 5 min) o filtrado (0,45 μm ϕ poro). Adicionalmente se ha recogido en ocasiones el sobrenadante producido durante las siguientes 24 h, aunque su título suele ser algo menor. El sobrenadante ha sido usado para la transducción celular bien inmediatamente o bien tras su congelación, siendo en este caso titulado de nuevo antes de su utilización.

Para la titulación de los sobrenadantes virales, estos fueron diluidos (1:100) en DMEM suplementado con 10% FBS inactivado conteniendo 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma). Los sobrenadantes diluidos fueron añadidos a las NIH-3T3 (1 ml de sobrenadante diluido/ 3×10^5 células por placa de 60 mm) y las células se incubaron toda la noche a 37 °C en un incubador humidificado con 5% de CO_2 . Posteriormente el sobrenadante viral se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células fueron incubadas durante otros 2 - 3 días antes de cuantificar por citometría la población que expresaba el marcador (GFP⁺). El título (unidades infectivas por ml, TU/ml) fue medido como:

$$(\% \text{ células positivas}) \times (\text{n}^\circ \text{ células en el momento de la transducción}/100) \times (\text{factor de dilución})$$

El protocolo de transducción consistió en la incubación de las células, bien adherentes (3×10^5 por placa de 60 mm) o bien en suspensión (1×10^6 por placa de 60 mm), con 1 ml de sobrenadante retroviral conteniendo 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma). En el caso de células adherentes se deja incubando durante 18 h, mientras que en el caso de células en suspensión, éstas se centrifugan durante 4 h a 32 °C y 1000 g en adaptadores flotantes y se incuban 4 h a 37 °C y 5% CO_2 , tras lo cual se repite el ciclo de transducción (centrifugación e incubación) con nuevo sobrenadante viral.

Terminada la transducción se reemplaza el sobrenadante viral por medio fresco y 2 o 3 días después de la transducción las células se analizan en un citómetro BECKMAN Coulter EPICS y se purifican por FACS en los experimentos que lo requieran (Aptdo. 2.13).

2.11. Inmunodetección de proteínas fijadas a membrana (Western Blot)

2.11.1. Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales de células y órganos se realizó en el tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% Na-deoxicolato, 0,1% SDS y una tableta de inhibidores de proteasas) (Complete™, Roche Diagnostics, Alemania)). Por cada 2×10^7 células se añaden 100 μl de RIPA, se pipetea enérgicamente y se incuba 15 min a 4 °C con agitación orbital. Los restos celulares se eliminan por centrifugación a 10000g 15 min a 4 °C. La concentración de proteínas se determina colorimétricamente en un espectrofotómetro (595 nm) mediante el sistema Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.11.2. Separación de proteínas y transferencia a filtro

Para los ensayos de detección, 50 μg (extractos de órganos) o 25-50 μg (extractos de líneas celulares) se diluyen en tampón de carga desnaturalizante (25 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% SDS, 5% glicerol, 2,5% 2- β -mercaptoetanol, 1 mg/ml azul de bromofenol) y se desnaturalizan durante 5 min a 100 °C. Las muestras se cargan en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) para su separación electroforética según el método descrito (Laemmli, 1970).

Las proteínas una vez resueltas se transfieren a membranas de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM glicina, 20% metanol (v/v)) mediante el aparato de transferencia en semiseco Transblot-SD (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA).

2.11.3. Inmunodetección

Las membranas se bloquean en 5% de leche desnatada en polvo (p/v) en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v) pH 7,5 (TBST) en agitación durante toda la noche a 4 °C o 1 h a temperatura ambiente. La membrana se incuba a continuación con el primer anticuerpo (a la dilución apropiada) en TBST-5% leche durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación se realizan 3 o 4 lavados de 10 min con TBST en agitación fuerte y se incuba con el anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa, en TBST-5% leche durante 45 min a temperatura ambiente y con agitación. A continuación se realizan varios lavados con TBST y se revela mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) y películas X-OMAT (Kodak). Las películas de revelado fueron digitalizadas utilizando un escáner UMAX VistaScan.

Los anticuerpos utilizados y su dilución se indican en la tabla del punto 1.3.

2.11.4. Deshibridación y reutilización de membranas (*stripping*)

Las membranas se pueden conservar un tiempo manteniéndolas a 4 °C en TBS-0,05% azida sódica, de modo que cuando fue conveniente reutilizar las membranas para una segunda detección, los anticuerpos utilizados en la primera detección fueron eliminados incubando las membranas 5 min en una solución de tiocianato de guanidina 6 M en TBST (reutilizable) a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente la membrana se lava durante 5 min con TBST y se realiza el bloqueo inespecífico proteico inicial del *Western Blot* empleando TBST-leche al 5%.

2.12. Optimización del antisuero policlonal contra la β recombinasa

El antisuero anti- β -rec fue optimizado mediante su inmunoabsorción con un extracto proteico de células NIH-3T3. Se incubaron 1,8 μ g de antisuero con 1×10^7 células en 2 ml de solución de inmunoprecipitación (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,025% azida sódica, 1% BSA y una tableta de inhibidores de proteasas Complete™) con agitación orbital a 4 °C toda la noche. Posteriormente el antisuero se clarificó por centrifugación (10000 g 15 min a 4 °C). El sobrenadante resultante fue el antisuero utilizado en los experimentos de *Western Blotting* e inmunofluorescencia, manteniéndose almacenado a 4°C hasta su utilización.

El antisuero así obtenido fue generado para evitar la aparición de bandas o tinciones inespecíficas en los ensayos de inmunodetección, pues habiendo sido generado en conejo, existía la posibilidad de que reconociese numerosos epítomos murinos. La β -rec, al ser procariota, no está presente en células NIH-3T3, por lo que la especificidad del antisuero por ella en los experimentos posteriores no se vería afectada.

2.13. Citometría de flujo y FACS

La citometría de flujo fue utilizada tanto para el análisis de expresión del marcador Egfp en la línea celular NIH-3T3 como en el estudio de las diversas poblaciones linfoides en los ratones respondedores (Tgrec y KOsix). Las tinciones de citometría se efectuaron con los anticuerpos mencionados en el punto 1.3.

En la detección y purificación de la población Egfp⁺, las células no sufrieron tinción alguna, pues la Egfp posee autofluorescencia, y quedaron por tanto perfectamente viables para estudios posteriores.

Las células fueron contadas, lavadas con PBS-2% FBS y teñidas durante 30 min o 1 h en oscuridad con el primer anticuerpo a la dilución adecuada según cada caso. A

continuación se lavaron por centrifugación (800 g, 5 min) tres veces en PBS y se resuspendieron en PBS. Este proceso se repitió en caso de necesitar un segundo anticuerpo. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL (Coulter).

La separación de poblaciones mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) fue realizada en un EPICS Elite ESP de Coulter. Una vez purificada la población positiva al marcador, esta o bien se empleó en ensayos de PCR, *Southern Blot* o *Western Blot* o bien se mantuvo en cultivo hasta alcanzar un tamaño celular suficiente para los experimentos.

Los histogramas de citometría fueron adquiridos en el programa propio del citómetro e importados a Macintosh mediante el programa Adobe Illustrator.

2.14. Tinción hematoxilina-eosina de órganos parafinados

2.14.1. Inclusión de órganos

Los timos, bazos y ganglios en estudio se incluyeron en parafina siguiendo el protocolo que se describe a continuación: Después de la necropsia se cogen los órganos deseados. A continuación se fijan en 4% PFA durante 4 h. Se lava con PBS y se deshidratan los tejidos: alcohol 70%, 95%, 100% (3 veces) durante 30 min en cada solución, siempre con agitación. Se aclara con xileno (2 veces) durante 30 min en cada uno y finalmente se incluyen los órganos en 2 baños en parafina histológica (parafina I y II, Sigma-Aldrich) a 58 °C - 60 °C durante 30 min en la primera y 1 h en la segunda. Por último se embeben los órganos en parafina calentada a 58 °C - 60 °C utilizando moldes previamente calentados. Los cortes de los tejidos fueron realizados con un microtomo (leica RM 2155, Leica), con un espesor de 6 µm.

2.14.2. Tinción hematoxilina-eosina

En los cortes así obtenidos íbamos a realizar una tinción hematoxilina-eosina, para lo cual los desparafinamos y rehidratamos empleando el proceso que se detalla a continuación:

Se desparafinan los cortes con tres baños de xilol de 3 min cada uno.

Se hidratan las muestras siguiendo el protocolo:

- 2 baños de 3 min con etanol al 100%
- 1 baño de 3 min con etanol al 95%
- 1 baño de 3 min con etanol al 70%
- 1 baño de 3 min con agua destilada

Las tinciones se realizan a continuación:

- Tinción con HEMATOXILINA (Mayer) durante 2-12 min
- Lavar con agua durante 20 min como mínimo
- Deshidratar con etanol al 70% durante 2 min
- Teñir con EOSINA durante 2-8 seg
- Lavar con etanol al 95% en forma de 4 pases rápidos
- Dar 3 baños de 3 min con etanol al 100%
- Dar 3 baños, de 3 min con xilol

Montaje de las muestras: sobre el porta aún húmedo de xilol se añaden unas gotas de DePeX (Serva) e inmediatamente se pone el cubre y se eliminan las pompitas, dejando secar toda la noche en posición horizontal.

2.15. Inmunofluorescencia en células NIH-3T3 y linfocitos T

2.15.1. Preparación de células NIH-3T3

Las células NIH-3T3 fueron sembradas (5×10^4 células) encima de un cubreobjeto (20 mm lado) colocado en el pocillo de una placa de 12 pocillos (M12) 18 h antes de la fijación (en los experimentos de inducción hormonal el tratamiento con mibolerona incluyó este período).

2.15.2. Preparación de linfocitos T

Los linfocitos T fueron sembrados (5×10^4 células) 18 h antes de su fijación encima de un cubreobjeto (12 mm ϕ , Marienfeld) ubicado en el pocillo de una placa de 48 pocillos (M48), el cual, para incrementar la adhesión de las células sobre él había sido recubierto previamente con poli-L-lisina 1 mg/ml (Sigma).

2.15.3. Inmunofluorescencia

Las células fueron lavadas y fijadas en PBS con 3% PFA y 5% TritonX-100 durante 10 min a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces con PBST (PBS-0,1% Tween 20) durante 5 min en agitación constante. Las preparaciones fueron incubadas con PBS-10% suero de cabra (30 min a temperatura ambiente) para conseguir el bloqueo inespecífico, a lo que siguió la tinción en cámara húmeda con el primer anticuerpo (1 h a temperatura ambiente) diluido en PBST a la concentración adecuada. Después de lavar 3 veces con PBST y teñir en cámara húmeda con el anticuerpo secundario (40 min a temperatura ambiente), las células se lavaron y montaron en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, H-1200 y H-1000).

La Egfp fue visualizada sin tinción gracias a su autofluorescencia, como en el caso de la citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados y la dilución a la que se usaron son los indicados anteriormente (Apartado 1.3.). Para la tinción Hoechst, las células fueron incubadas con 0,8 μ g/ml de Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 5 min inmediatamente después de la incubación con el anticuerpo secundario. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio láser confocal (Leica TCSNT) y fueron procesadas y corregido el fondo utilizando el programa Adobe Photoshop.

2.16. Extracción de células linfoides murinas y enriquecimiento

2.16.1. Extracción de órganos

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y los diferentes órganos extraídos (hígado, cerebro, timo, bazo y ganglios mesentéricos y periféricos) fueron disgregados en sus componentes celulares individualizados y filtrados, resuspendiéndose en DMEM suplementado con 10 mM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-acido etanosulfónico) y 5 mM EDTA (ácido etilendiaminotetracético). Tras su lavado se centrifuga a 1000xg 10 min y se procede a eliminar los eritrocitos, provocando su lisis con una incubación durante 1-3 min a temperatura ambiente en CaNH_4^+ -Tris. Tras otro lavado, las células se centrifugan y los *pellets* se destinan a los experimentos pertinentes.

En los diferentes procesos de enriquecimiento celular en linfocitos T que se describen a continuación los timos de los animales se trataron de forma independiente, mientras que los bazos y ganglios de cada animal se unificaron en una sola muestra, si no se indica otra cosa.

2.16.2. Enriquecimiento en linfocitos B

El enriquecimiento en linfocitos B se realizó exclusivamente en el bazo de los animales doble transgénicos, utilizando para ello la selección positiva que aporta la separación inmunomagnética, MACS (*immunomagnetic cell sorting*). En un separador varioMACS (Miltenyi Biotec) se marcaron las células con CD19 MicroBeads, eluyéndose en primer lugar la fracción negativa (todos los tipos celulares excepto los linfocitos B), y obteniéndose posteriormente la fracción positiva al marcador (la fracción enriquecida en linfocitos B). La pureza de la fracción positiva fue analizada por citometría de flujo, resultando ser del \approx 95%. La fracción negativa por su parte vio incrementada en gran medida su proporción en células T (quedando una pureza del 75 - 80%).

2.16.3. Enriquecimiento en linfocitos T totales

Para lograrlo se siguió el protocolo de enriquecimiento de células T de SpinSep™ (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC) (#17061) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza en linfocitos T obtenida con este método osciló entre el 93 y el 98%.

2.16.4. Purificación de las distintas subpoblaciones de linfocitos T

En este caso la purificación se consiguió mediante separación por FACS: en las muestras se realizó una marcación triple CD3-FITC/CD4-SPRD/CD8-PE, de modo que en el timo se pudieron separar las poblaciones doble negativa (DN, CD4⁻/CD8⁻), simple positiva (SP, CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺) y doble positiva (DP, CD4⁺/CD8⁺), y en el bazo y ganglios las poblaciones DN y SP.

2.16.5. Obtención de linfocitos T activados

En su obtención se partió del bazo de ratones respondedores transgénicos al sustrato de recombinación (Tgrec) o de sus doble transgénicos con la β -rec. Los linfocitos T se purificaron siguiendo el protocolo del punto anterior. Se contaron y sembraron (5×10^5 /ml) sobre superficies de cultivo recubiertas con α -CD3 y α -CD28 (ver Aptdo. 1.3). A las 48 h de cultivo se añadió IL-2, lo que incrementó aún más su activación.

En el caso de los ratones respondedores (Tgrec), posteriormente a su activación en cultivo se procedió a su transducción retroviral. En los casos en que la mortandad era elevada (y podía por tanto disminuir significativamente la tasa de transducción de las células vivas) se eliminaron las células muertas por medio de una centrifugación en gradiente de Ficoll (Nycoprep™, NYCOMED PHARMA AS). La transducción se realizó siguiendo el protocolo indicado en el punto 2.10 para células en suspensión.

RESULTADOS

PARTE I: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN LÍNEAS CELULARES

Una parte importante de este trabajo se centra en el estudio de distintos modelos celulares del sistema de recombinación específica de secuencia mediado por la β -rec. Se pretendía con ello la determinación de su eficiencia real en cuanto a su aplicación en distintos campos de experimentación (nuevos vectores de expresión, sistemas inducibles de recombinación, etc.).

El primer objetivo abordado fue la construcción de las herramientas necesarias para el desarrollo de los distintos modelos que íbamos a estudiar. Esperábamos además que estas herramientas se convirtiesen en unos vehículos altamente eficaces y versátiles, con amplias expectativas futuras de utilización. Posteriormente nos focalizamos en la elaboración de dos modelos de RAGE, que determinarían las posibilidades reales del sistema en los experimentos *in vitro*. Uno de ellos constituiría además el primer modelo inducible para el sistema de la β -rec, lo que nos orientaría sobre la potencialidad futura del sistema en las diversas variantes de activación génica condicional (Introducción).

1. DESARROLLO DE VECTORES RETROVIRALES

En el momento de iniciar este trabajo existían ya diversos vectores de expresión eucariotas para la β -rec, tanto de forma independiente como en forma de fusión con la Egfp. Sin embargo nos propusimos la elaboración de un sistema alternativo que permitiese, de forma sencilla y eficaz, una alta y permanente expresión de dicha proteína en numerosas líneas celulares.

En este sentido, el sistema de transducción retroviral nos pareció la mejor alternativa, puesto que se trataba de un sistema de amplia utilización en nuestro laboratorio con el que se estaban alcanzando títulos infectivos muy altos ($>10^7$ TU/ml) en diversas líneas celulares, tanto primarias como transformadas.

Por otra parte quisimos estudiar si este sistema nos permitiría además la construcción de vectores retrovirales conteniendo el sustrato de recombinación, lo que aportaría indudablemente flexibilidad a este sistema de cara a sus potenciales aplicaciones futuras.

Los retrovirus son virus ARN que tienen una envuelta fosfolipídica, con glicoproteínas que determinan el tropismo del virus al ser reconocidas por receptores celulares específicos. Dentro de esta envuelta hay una cápside proteica de estructura icosaédrica que contiene 2 copias del genoma viral, la transcriptasa inversa (RT) y la integrasa. El genoma de un retrovirus es una molécula de ARN de polaridad positiva en la que se distinguen 3 tipos de genes: genes *gag* (que codifican las proteínas de la cápside), genes *pol* (que codifican las enzimas necesarias para el ciclo viral, como la polimerasa, proteasa y la integrasa) y genes *env* (que codifican las glicoproteínas de la envuelta). El genoma está flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeat*), y contiene también una señal de empaquetamiento (PSI) mediante la cual las moléculas de ARN se unen a las proteínas de la cápside y son empaquetadas eficazmente.

Los vectores retrovirales para terapia génica se obtienen a partir de retrovirus naturales, en los cuales se reemplazan sus genes estructurales (los de la polimerasa, integrasa, cápside y la envuelta), por uno o varios genes de interés (gen en estudio, marcador, etc.). El vector conserva únicamente los LTRs y las secuencias de nucleótidos que sirven de señales

para empaquetar la partícula viral y para dirigir la inserción dentro del genoma celular (Fig. 8a); el sistema necesita por tanto de unas células empaquetadoras, las cuales han sido modificadas previamente para o bien producir ellas mismas las proteínas virales necesarias para la formación de una partícula viral vacía (son las llamadas líneas empaquetadoras estables), o para necesitar de forma transitoria la cotransfección del vector retroviral con otros vectores que porten las proteínas estructurales (en la denominada producción transitoria). Este es el método utilizado en este trabajo, que podemos ver reflejado en la figura 8b. De este modo vemos que, introduciendo el vector retroviral en dichas células, se logra (por transcomplementación) encapsidar partículas virales infecciosas portadoras del vector, las cuales son liberadas al sobrenadante del cultivo celular, que se utilizará para transducir las células o el tejido diana. Una vez que la célula diana es transducida, el material genético viral se integra al azar en el genoma celular y la ausencia de genes virales estructurales en dichas células asegura que no haya en ellas producción de partículas virales (vectores defectivos en replicación), ni movilización de las secuencias retrovirales.

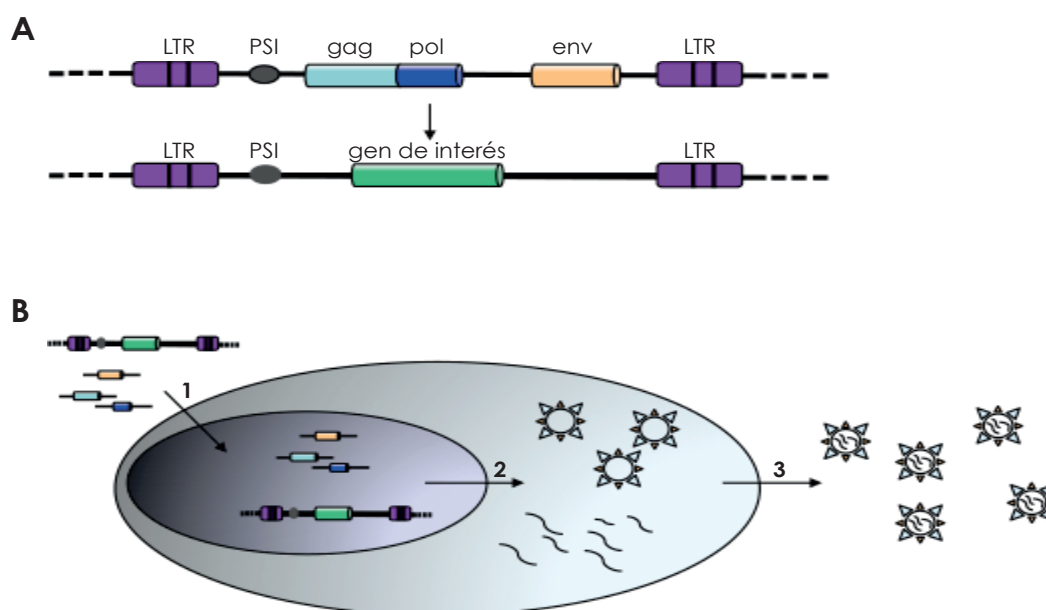


Figura 8. Vector retroviral y producción de partículas virales infecciosas. A) Estructura de un retrovirus, donde vemos los principales genes de la envuelta (env), polimerasa (pol) y cápside (gag) y su sustitución por el gen de interés en un vector retroviral clásico. **B)** Introducción en las células empaquetadoras del vector retroviral y los plásmidos de expresión de las proteínas estructurales/catalíticas necesarias (1); Producción en dichas células de partículas virales vacías y RNA viral (2), que por transcomplementación darán lugar a partículas virales completas (3) capaces de infectar las células diana (infectivas y defectivas en replicación).

1.1. Vectores de expresión de la actividad β recombinasa

1.1.1 Proceso de clonaje y análisis proteico de la Egfp y la β recombinasa

Para las construcciones que debían incluir el gen de la β -rec partimos de un esqueleto común, el pLZRCMV-IRES-Egfp (Abad et al., 2002); este vector incluía el gen marcador Egfp y nos permitía insertar nuestro gen delante del IRES, de modo que la traducción de ambos productos génicos fuese independiente, pero en el mismo mRNA, o bien introducir nuestra proteína de fusión β -Egfp como un solo cistron, intercambiándola por la secuencia IRES-Egfp.

En el caso de utilizar la proteína β -rec sin fusionar, el gen se amplificó por PCR con los oligonucleótidos beta(RES)-3, que introducía un sitio de restricción EcoRI tras el codón de

terminación, y beta(RES)-5, que aportaba un sitio BamHI antes del codón de iniciación. Se empleó la Taq Gold DNA polimerasa (Roche), y como molde utilizamos el plásmido pBT233 (ver Mats. y Metds.). Posteriormente el fragmento de 630 pb obtenido por PCR se digirió con las enzimas mencionadas y se subclonó en pLZRCMV-IRES-Egfp (Yang et al., 1999), resultando el vector retroviral pLZR- β -IRES-Egfp (Fig. 9).

Para el caso del vector de fusión pLZR- β -Egfp, el plásmido p β Egfp (Diaz et al., 2001) se digirió con las enzimas BamHI y NotI y se subclonó en pLZR-CMV-IRES-Egfp, resultando el vector pLZR β Egfp (Fig. 9).

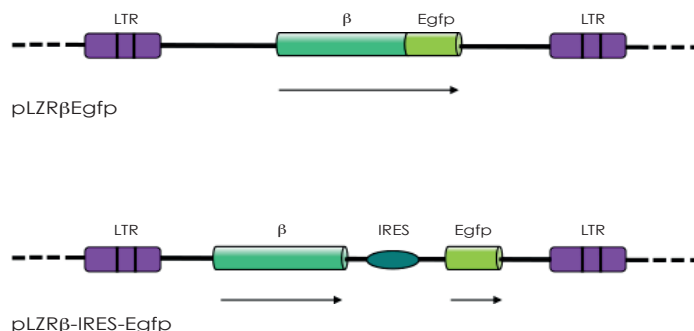


Figura 9. Estructura de los vectores retrovirales portadores de β -Egfp y β -IRES-Egfp. Las flechas indican los productos resultantes de la traducción proteica. En el caso del pLZR- β -Egfp, el ARNm dará lugar a una única proteína de fusión (la fusión se produce entre el extremo carboxilo de la β -rec y el amino de la Egfp); en el pLZR- β -IRES-Egfp el transcrito de ARNm dará lugar a dos proteínas independientes.

Verificamos que ambos vectores presentaban la secuencia correcta y se procedió a su transfección en la línea empaquetadora 293T, siguiendo el protocolo estándar de transducción retroviral (Mats. y Metds.). Tras detectar la presencia de Egfp por visualización directa y citometría (datos no mostrados) se transdujo la línea murina NIH-3T3, analizándose por citometría la expresión de Egfp que presentaban. Como se puede observar en un experimento representativo de transducción retroviral (Fig. 10a), en ambas transducciones la fracción Egfp⁺ alcanza prácticamente la totalidad del cultivo; en la titulación hemos llegado a obtener valores de $1,2 \times 10^7$ TU/ml para el vector pLZR- β -IRES-Egfp y $1,5 \times 10^7$ TU/ml para el vector pLZR- β -Egfp. Esto indicaba, de manera directa en el caso de la proteína de fusión, que la β -rec se estaba expresando, pero quisimos asegurarnos mediante su análisis por Western Blot, empleando anticuerpos contra ambas proteínas.

Como se muestra en la figura 10b, la expresión tanto de β -rec como de Egfp quedó confirmada por la aparición de las bandas correspondientes a las proteínas individuales (25 kDa y 27 kDa, respectivamente) en el caso de las células transducidas con el pLZR- β -IRES-Egfp y de una misma señal para ambas anticuerpos de 50 kDa en el caso del pLZR- β -Egfp.

1.1.2 Análisis de la actividad recombinasa

Una vez comprobada la expresión de las proteínas el siguiente paso fue la determinación de su actividad. Para ello electroporamos NIH-3T3 con el plásmido pRECOMBINER (Diaz et al., 2001) como sustrato de la recombinación (Fig. 11a) y seleccionamos la población positiva por su resistencia al antibiótico puromicina. Infectamos el cultivo con sobrenadante viral del pLZR- β -IRES-Egfp y pLZR- β -Egfp y, sin purificar las poblaciones resultantes, analizamos la presencia de producto recombinado.

El análisis se realizó con los oligonucleótidos sixUP y sixDO, los cuales permitían amplificar la banda de recombinación (400 pb). Como se puede ver en la figura 11b, se detectó el producto recombinado en las muestras transducidas con β -rec, mientras que en las células control, es decir, transducidas con el vector control pLZRCMV-IRES-Egfp, éste resultó indetectable.

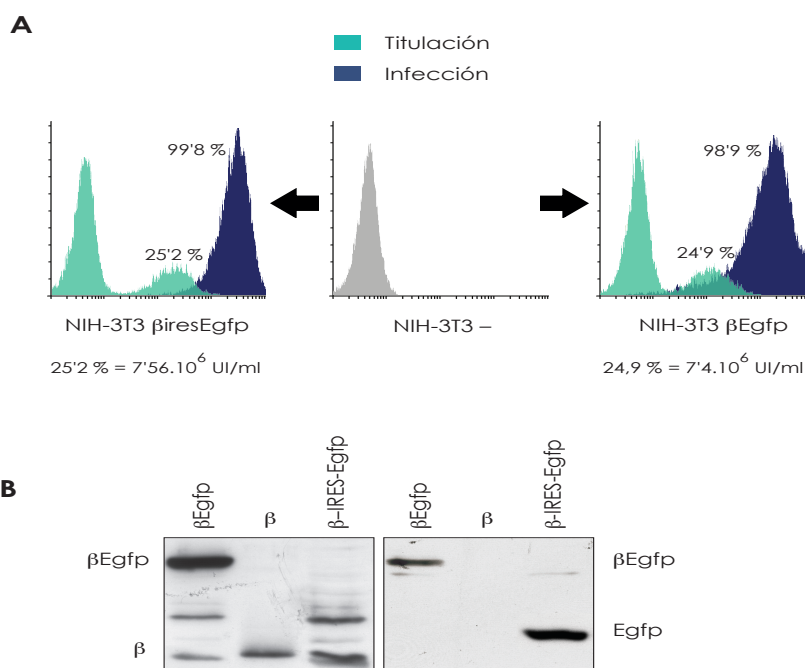


Figura 10. Infección retroviral en células NIH-3T3 y análisis de la expresión de β -rec y β -Egfp. **A)** Los valores de titulación e infección fueron muy similares para los dos vectores retrovirales, lográndose unos títulos muy elevados ($>7 \cdot 10^6$ UI/ml) y casi el 100% de infección en ambos casos a las 48h de la infección. **B)** Western Blot con el anticuerpo anti- β ; se aprecian las bandas correspondientes a la β -rec (25 KDa) y a la fusión β -Egfp (50 KDa). Como control se emplearon 5 ng de β -rec purificada (β). Se pueden ver también las bandas correspondientes a la Egfp, tanto sola (27 KDa) como en la fusión (50 KDa). No se aprecian bandas derivadas de la degradación de la proteína de fusión, lo cual es un indicador de su estabilidad.

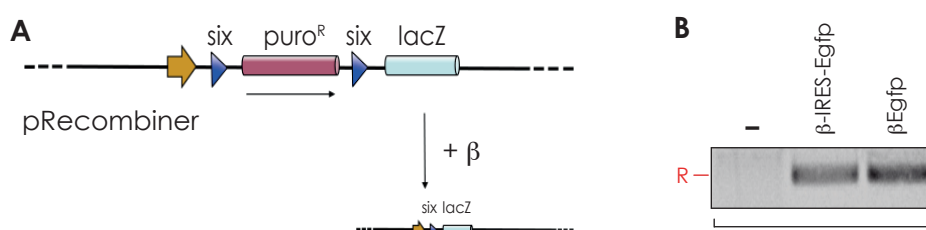


Figura 11. Determinación de capacidad de recombinación de β -rec y β -Egfp en un sustrato de RAGE integrado en la cromatina. **A)** Se muestra la estructura del plásmido pRECOMBINER, que lleva la construcción sustrato (six-puro^R-six) en orientación directa bajo el control del promotor CMV (flecha naranja); tras el segundo six se encuentra el gen *LacZ*, que codifica para la proteína β -galactosidasa de forma condicional a la recombinación específica de secuencia. Las flechas indican la traducción proteica. **B)** Banda de amplificación del producto recombinado (400 pb) en poblaciones de células NIH-3T3 que han integrado de forma estable el pRECOMBINER y que han sido transducidas con los dos vectores retrovirales (pLZR- β -IRES-Egfp y pLZR- β -Egfp). No se aprecia amplificación alguna en el control (-), lo que confirma la especificidad de la reacción. R, recombinado.

1.2. Vectores que incluyen sustratos de recombinación

En el desarrollo de los vectores retrovirales que contendrían el sustrato de recombinación seguimos dos estrategias diferentes; lo que en ambas se buscaba, aunque de manera distinta, era la expresión condicional a la recombinación específica de secuencia de un gen marcador de fácil detección y amplia aplicabilidad (Egfp).

1.2.1. Estrategia I: Construcción de los vectores y análisis citométrico de la expresión del transgen

Lo que nos planteamos era la colocación en un vector retroviral de dos genes colocados en *tándem* pero no fusionados; el vector contendría únicamente el promotor viral y lo que pretendíamos era que éste no fuese capaz de leer el segundo iniciador de traducción. Como se ve en la figura 5a, el casete que colocamos entre los dos LTRs contenía el gen *ccr5kdel*, provisto de una señal de terminación de traducción pero no de transcripción (lo que hubiese abortado la correcta transcripción viral), seguido del gen de la Egfp, ambos en el mismo sentido que el promotor viral. Si este vector funcionaba como esperábamos, inhibiendo la expresión del segundo gen, colocaríamos delante del gen de la Egfp (sustituyendo al *ccr5kdel*) el casete *six-puromicina^R-six (sps)* (Fig. 12a); la construcción final expresaría Egfp condicionada a la recombinación específica del casete y consiguiente desaparición de la señal de parada de traducción.

Para su construcción utilizamos como esqueleto retroviral el pRV, el cual es esencialmente equivalente al vector pLZR (Abad et al., 2002). En el caso del vector control, que solo contendría el gen de la Egfp, ésta se obtuvo del pEgfp-N1 por digestión con XhoI y NotI y dio lugar al pRV-Egfp. En la construcción del vector en estudio, el gen *ccr5kdel* se extrajo del plásmido pCDNA3.CCR5KDEL con BamHI y XhoI y se insertó en los mismos sitios del esqueleto pRV; posteriormente la Egfp se clonó de la misma manera que en el vector control, resultando el pRV-*ccr5kdel*-Egfp.

Los vectores ya generados y secuenciados se testaron en la línea empaquetadora 293T. Como se puede observar en la figura 12b, las células transfectadas con el vector control presentaban en el estudio citométrico una alta expresión de Egfp. Sin embargo, también obtuvimos una fuerte expresión del transgen en las células transfectadas con el pRV-*ccr5kdel*-Egfp; esto no era lo esperado, pero era posible que se debiese al elevado número de copias retrovirales que presentaban estas células, lo que haría patente cualquier escape en la traducción, por pequeño que fuese; esperábamos que en la transducción de las células diana, donde sólo se introducirían unas pocas copias por célula, dicho escape fuese despreciable.

Se transdujeron las células diana (NIH-3T3) con el sobrenadante obtenido, analizándose a las 48h la presencia del gen marcador. Como se observa en la figura 12c, la expresión de la Egfp se mantenía no sólo en las células transducidas con el virus control, sino también en las transducidas con el virus en estudio, donde, a pesar de ser menos intensa, seguía siendo muy elevada; esto descartaba su empleo como control negativo. Este resultado se confirmó en experimentos independientes, de modo que no llegamos a construir el vector pRV-sps-Egfp y desechamos esta estrategia en la elaboración de vectores retrovirales respondedores.

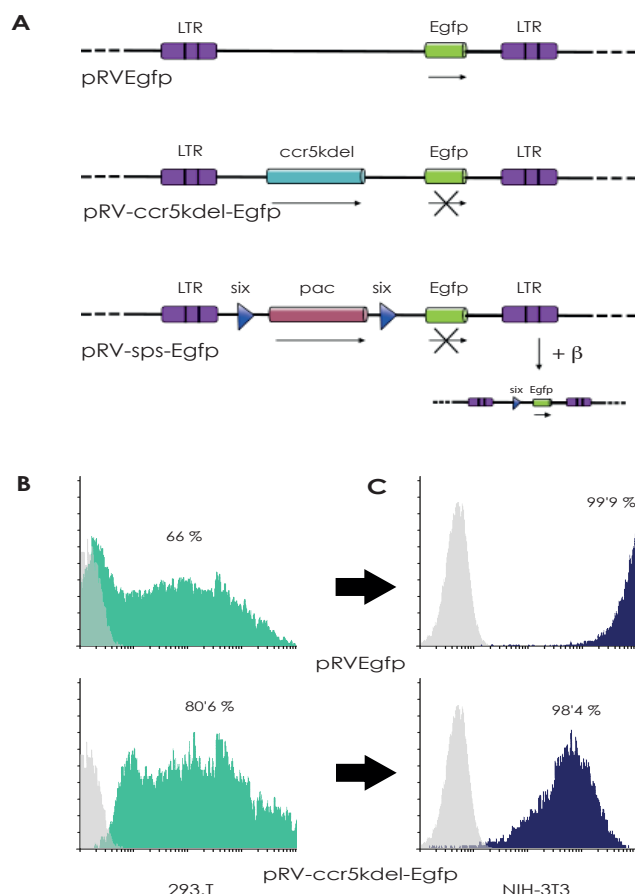


Figura 12. Obtención de vectores retrovirales que portan el sustrato de la recombinación: Estrategia I.

A) Se muestran las construcciones empleadas en esta estrategia: el pRVEgfp, que contiene únicamente el gen de la Egfp; el pRV-ccr5kdel-Egfp, que contiene el ccr5kdel previo a la Egfp, lo que se espera interrumpa su expresión; el pRV-sps-Egfp, con el casete six-puro^R-six (sps) con los dos six en orientación directa antes de la Egfp. Las flechas indican la traducción proteica esperada, con la inhibición teórica de la traducción de Egfp en el plásmido intermedio y en el definitivo previo a la recombinación. En éste último, una vez recombinado, se desbloquea su traducción.

B) Citometría de los vectores pRVEgfp y pRV-ccr5kdel-Egfp en células empaquetadoras 293.T. **C)** Citometría de ambos vectores en células NIH-3T3.

1.2.2. Estrategia II: Construcción de los vectores y análisis citométrico de la expresión del transgen

La segunda estrategia consistía en la construcción de un vector en el que las secuencias virales y nuestro casete de recombinación tuviesen sentidos opuestos de lectura (Fig. 13a). Nuestro casete iría precedido de un promotor interno que permitiría su propia regulación y expresión sin afectar a los procesos replicativos y transcripcionales del virus.

Para llevar a cabo esta estrategia necesitábamos un tipo especial de retrovirus que una vez integrado en el genoma celular perdiese su propio promotor; esto impediría la transcripción viral, que hubiese interferido con la del casete introducido: los virus autoinactivantes (*Self-INactivating*, SIN) cumplían esta condición, quedando exclusivamente como vehículos de nuestra construcción.

Utilizando como esqueleto viral el pSINloxP nos propusimos la construcción de tres vectores diferentes, mostrados en la figura 13a: el pSINloxP-CMV-Egfp, que utilizaríamos como control básico del funcionamiento de estos vectores; el pSINloxP-as(CMV-Egfp), control positivo de la expresión de Egfp en antisentido y por último el pSINloxP-as(CMV-sps-Egfp), donde la expresión de Egfp estaba condicionada a la recombinación mediada por la β -rec; el clonaje de este último vector se pospuso hasta analizar los resultados de los controles.

El pSINloxP-CMV-Egfp se obtuvo a partir del vector pRVSINloxP por digestión XhoI/SwaI; los extremos se hicieron romos, así como los del fragmento AseI/AflII del plásmido pEgfp-N1, que iba a clonarse en el esqueleto mencionado; el fragmento contenía la Egfp situada tras el promotor CMV. Una vez realizado el clonaje se verificó por restricción que mantenía el mismo sentido de lectura que el promotor viral.

Para la generación del pRVSINloxPas(CMV-Egfp) se partió también del pRVSINloxP. Lo primero fue eliminar el sitio NotI del pEgfp-N1, haciendo romos y religando. Paralelamente

se introdujo el CMV del pCDNA3(neo) en el vector pUC-SN con las enzimas NruI/BamHI, dando el pUC-CMV, donde, por digestión con BamHI y AflII, se clonó el Egfp del pEgfp-N1 modificado anteriormente. Por último se introdujo el casete CMV-Egfp en el esqueleto pRVSINloxP, empleando Swal y NotI, y verificando en este caso que el casete insertado quedaba en sentido inverso al promotor viral.

Para el clonaje del pRVSINloxPas(CMV-sps-Egfp) se digirió el esqueleto pRVSINloxPas(CMV-Egfp) con HindIII y en el se clonó el casete sps obtenido con la misma digestión del pRECOMBINER; la verificación final del sentido de lectura se realizó digiriendo el vector resultante con SacII y NdeI, que dan una serie de fragmentos de tamaño variable en función de la orientación del casete sps. En paralelo también se generó el pRVSINloxPas(CMVLacZ), pero no se llegó a construir el pRVSINloxPas(CMVspSLacZ) dados los resultados obtenidos con el vector que portaba la Egfp (ver más adelante).

Al igual que en la estrategia anterior se testaron las construcciones en la línea empaquetadora 293T; pudimos apreciar (Fig. 13b) una alta expresión de Egfp en ambos casos, lo que constituía un resultado esperanzador. En el siguiente paso se procedió a la transducción retroviral y análisis citométrico de las células diana (NIH-3T3); como se puede observar en la figura 13c, mientras que en el caso del pSINloxP-CMV-Egfp la expresión de Egfp se mantenía, a pesar de haber bajado en intensidad, en el caso del pSINloxPas(CMV-Egfp) no veíamos en absoluto expresión de Egfp. Este resultado, reproducible en todas las transducciones que realizamos, nos indicaba que el promotor interno quedaba inactivo una vez integrada la construcción en el genoma celular. Lamentablemente esto imposibilitaba la funcionalidad de esta estrategia en el abordaje de nuestro modelo.

A la vista de estos resultados decidimos desechar la utilización de los vectores retrovirales como vehículos de introducción del sustrato de recombinación en la célula y por tanto proseguimos la caracterización del sistema utilizando los vectores episomales clásicos.

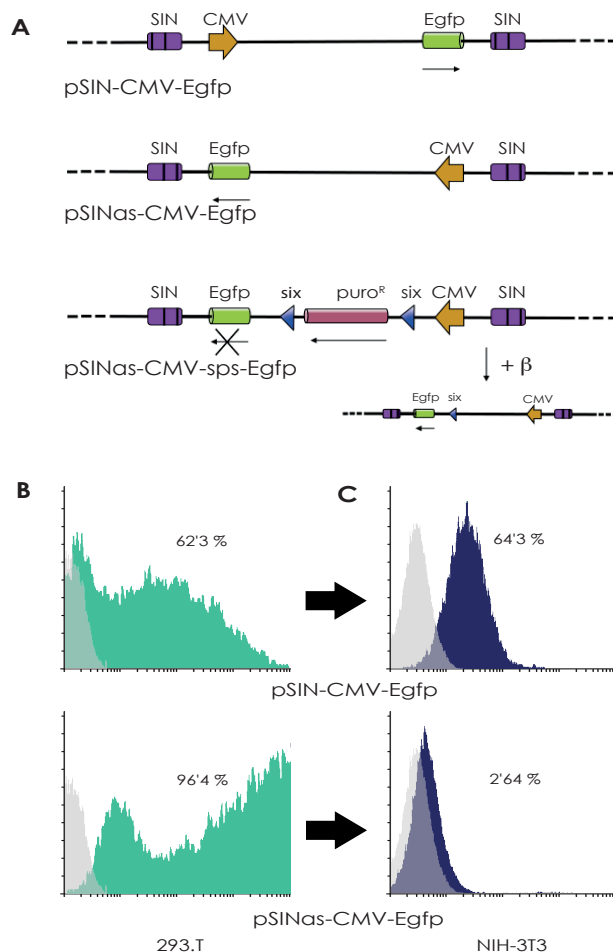


Figura 13. Obtención de vectores retrovirales que portan el sustrato de la recombinación: Estrategia II.

A) Se muestran las construcciones empleadas en esta estrategia: el pSIN-CMV-Egfp, que contiene el gen de la Egfp tras el promotor CMV; el pSINas-CMV-Egfp, que contiene en antisentido a las secuencias virales el gen de la Egfp tras el CMV, y el pSINas-CMV-sps-Egfp, que contiene en antisentido el CMV, el casete six-puro^R-six (sps) y la Egfp. Las flechas indican la traducción proteica esperada, donde vemos expresión de la Egfp en los dos primeros vectores e inhibición en el plásmido definitivo en ausencia de recombinación. Una vez recombinado, se desbloquea su expresión. **B)** Citometría de los vectores pSIN-CMV-Egfp y pSINas-CMV-Egfp en células empaquetadoras transitorias 293T. **C)** Citometría de ambos vectores en la línea celular murina de fibroblastos NIH-3T3.

2. ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN MEFs DEFICIENTES EN HMG1

Una vez demostrada la actividad de la β -rec codificada en los vectores retrovirales, quisimos aprovecharlo para estudiar más a fondo uno de los requerimientos que tenía el sistema de recombinación específica de secuencia mediado por la β -rec: la presencia de un cofactor o cofactores de la reacción. A diferencia de otras recombinasas como Cre o FLP, la β -rec requería, *in vitro*, una proteína accesoria para realizar la recombinación. Se había visto (Díaz et al., 2001) que la reacción era capaz de producirse *in vitro* en presencia exclusivamente de HMG1, y quisimos determinar si, en un entorno eucariota, el papel de la proteína HMG1 como cofactor de la reacción de recombinación era exclusivo o si por el contrario existían otras proteínas contribuyendo a la misma función, y por tanto, capaces de reforzarla o sustituirla *in vivo* de forma eficaz.

Para ello utilizamos fibroblastos murinos embrionarios (MEF; *Mouse Embryonic Fibroblasts*), con dos variantes: células provenientes de una cepa murina silvestre (HMG1wt) y células procedentes de una cepa murina deficiente para HMG1 (HMG1ko), cedidas amablemente por el Dr. M. Bianchi (Milán, Italia) (Calogero et al., 1999); de este modo, si éramos capaces de detectar recombinación en dichas células podríamos concluir que el entorno eucariota provee sin duda alguna los cofactores necesarios para la consecución de la reacción.

En este estudio se empleó únicamente la proteína de fusión (β -Egfp) puesto que el seguimiento de β mediante análisis citométrico era más fiable y no había sido detectado ningún problema de expresión o actividad derivado de dicha fusión. Ambas líneas se transdujeron con sobrenadante viral del pLZR- β -Egfp y se seleccionaron las células Egfp⁺ por FACS; en ellas se electroporó el pRECOMBINER como sustrato de reacción y a las 24 horas de la transfección buscamos el producto recombinado (0,4 Kb) empleando los oligonucleótidos sixUP/sixDO. Como control interno se emplearon los oligonucleótidos LacZ-1 y LacZ-2, los cuales amplificaban un fragmento de 351 pb interno al gen LacZ en las mismas condiciones de reacción que la pareja sixUP/sixDO.

Como se puede observar en la figura 14, la PCR semicuantitativa (Mats. y Metds.) confirmó la ausencia de recombinación espontánea del sustrato y no mostró diferencia alguna entre las dos líneas celulares, donde si se detectó producto recombinado. Este resultado demostró inequívocamente la presencia de otras proteínas capaces de actuar como cofactores de la reacción, lo que colocaba nuestro sistema al mismo nivel que los demás en cuanto a requerimientos de reacción *in vivo* en organismos eucariotas.

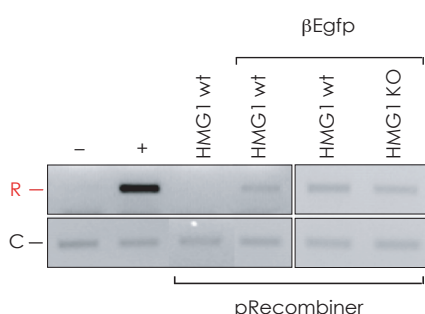


Figura 14. RES mediada por la β -Egfp en una línea celular deficiente en HMG1. El análisis fue llevado a cabo mediante PCR semicuantitativa con los oligonucleótidos sixUP y sixDO, que detectan específicamente el fragmento recombinado. El punto (-) corresponde al plásmido pRECOMBINER y el punto (+) al plásmido pgal. El panel superior muestra la tasa de recombinación en células HMG1ko y HMG1wt transducidas o no con el vector retroviral pLZR β -Egfp. El panel inferior muestra la banda de amplificación del gen LacZ obtenida con los primers lacZ-1 y lacZ-2, utilizada como control interno de la reacción (C). R, recombinado.

3. MODELO DE ACTIVACIÓN GÉNICA MEDIADA POR RECOMBINACIÓN (RAGE)

Con los vectores de expresión de la β -rec anteriormente obtenidos nos propusimos el desarrollo de un sistema de activación génica mediado por recombinación (*Recombination Activated Gene Expression*, RAGE) en el que determinar su eficacia. Como se ha visto en la Introducción, ya existía un modelo previo de RAGE para el sistema de la β -rec, donde se demostró la funcionalidad de la proteína para recombinar tanto sustratos episomales como integrados en la cromatina (Díaz et al., 2001). Nosotros habíamos empleado esta construcción en el estudio del cofactor de reacción HMG1 (ver punto anterior). En este modelo la recombinación del sustrato (pRECOMBINER) daba lugar a la expresión del gen marcador β -galactosidasa, indetectable en ausencia de la recombinasa.

Decidimos abordar un nuevo modelo de RAGE utilizando la luciferasa como gen marcador; esto constituiría una prueba más de su funcionalidad y además permitiría potencialmente un análisis *in vivo* del animal (Contag et al., 1997). Por otra parte su diseño nos permitiría la detección no solo de la banda recombinada, como en el caso del pRECOMBINER, sino también de la banda sin recombinar, de forma que se pudiese cuantificar la reacción y determinar la eficacia real del proceso.

3.1. Construcciones utilizadas: Proceso de clonaje y ensayo de recombinación *in vitro* (RIV)

Los plásmidos sustrato (Fig. 15a) se generaron a partir de distintos vectores primarios, que aportaron los fragmentos de interés. Del pCDNA3.1-Hygro obtuvimos el esqueleto plasmídico, el cual nos permitiría la selección celular por resistencia al antibiótico higromicina. En él clonamos en primer lugar el gen de la luciferasa, obtenido del pRVSINloxPTP-Luc-IRES- Δ NGFR HindIII/XbaI, resultando el pCMV-Luc-Hygro. Este se abrió con MluI y NheI para quitar su propio promotor e introducir, gracias a la compatibilidad en los extremos, el promotor del factor de elongación proteico humano, EF-1 α , obtenido del pEF-4^aMyc-His con MluI y SpeI. Se seleccionó el promotor EF-1 α por tratarse de un promotor de expresión fuerte en numerosas líneas celulares. Esta ligación dio como resultado el plásmido p-Luc, que sería utilizado como control positivo de expresión de luciferasa. El vector condicional de recombinación, p-sps-Luc-Hygro (p-sps-Luc), se obtuvo del subclonaje en el p-Luc del casete HindIII del pRECOMBINER. La resistencia a puomicina sería utilizada en el mantenimiento de estables a la construcción en su forma no recombinada.

Una vez obtenido el sustrato de recombinación se comprobó su funcionalidad *in vitro*. En los ensayos de recombinación *in vitro* (RIV) se añade la mezcla de reacción (formada por la β -rec y su cofactor Hbsu) al ADN de interés. Tras el seguimiento de un protocolo determinado (Mats. y Metds.) se analizaron por restricción con MluI y NcoI los plásmidos resultantes, que darían, en caso de haber recombinado, bandas a 1015 pb y 1600 pb, ausentes en el plásmido no recombinado. Como muestra la figura 15b, nuestra construcción resultó funcional y pudimos comenzar el estudio del modelo.

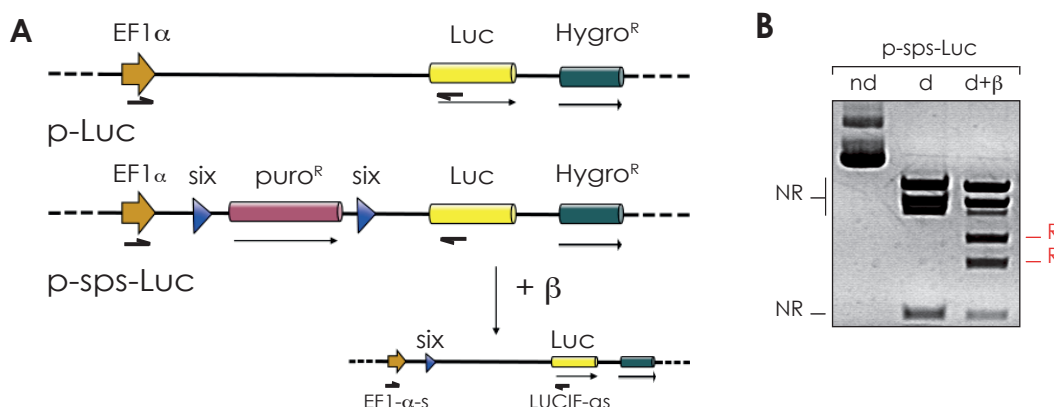


Figura 15. Estudio inicial del modelo de RAGE. A) Esquema del vector condicional de recombinación (p-sps-Luc) y su vector control (p-Luc). El p-Luc contiene el gen marcador (luciferasa) tras el promotor EF1 α . El vector pSps-Luc contiene el casete six-puro^R-six entre ellos con los six en orientación directa, de modo que la expresión del marcador está condicionada a la recombinación específica de secuencia. Las flechas indican la traducción proteica. Se indica también la posición de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de la RES por PCR (EF1- α -s y LUCIF-as). **B)** Análisis de la recombinación por RIV. Se aprecian las bandas derivadas de la recombinación (R) únicamente en la muestra que ha recibido la β -rec. NR, no recombinado.

3.2. Estudio de la localización celular de las proteínas β -Egfp y β -IRES-Egfp

Como se describió en la Introducción, en células eucariotas la localización de la β -rec, tanto sola como fusionada a la Egfp, resultaba ser exclusivamente nuclear, con una marcada preferencia por las zonas de heterocromatina (Díaz et al., 2001). Nuestras construcciones retrovirales habían demostrado producir la enzima (Fig. 9) y ésta era capaz de provocar recombinación *in vitro*, pero quisimos comprobar que el entorno viral en que se encontraba, con sus elementos reguladores y potenciales interacciones, permitía a la recombinasa llegar al núcleo celular, pues podría haber alterado en cierta medida la localización original de la proteína.

Para ello transdujimos de nuevo la línea murina NIH-3T3 con ambos sobrenadantes virales y analizamos por inmunofluorescencia las poblaciones celulares obtenidas. En la visualización de la Egfp se aprovechó su autofluorescencia mientras que la recombinasa se detectó con el anticuerpo anti- β . Como se puede observar en la figura 16, en las células que expresaban la proteína de fusión β -Egfp, ambas proteínas colocalizaban en el núcleo celular, mayoritariamente en forma de agregados; en la modalidad β -IRES-Egfp, donde ambas proteínas se traducen de forma independiente, vemos que mientras la β -rec mantenía su localización exclusivamente nuclear, la Egfp se hallaba, como era de esperar, dispersa por la célula sin un patrón definido.

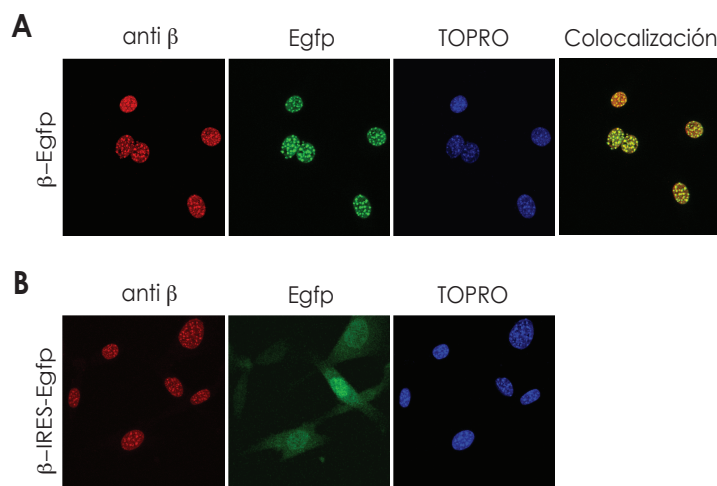


Figura 16. Estudio de la localización de la β -rec y la β -Egfp por inmunofluorescencia.

A) Infección de la línea celular NIH-3T3 con el sobrenadante del vector retroviral pLZR- β -Egfp. **B)** Infección de la línea celular NIH-3T3 con el sobrenadante del vector retroviral pLZR- β -IRES-Egfp. TOPRO se une específicamente al ADN.

3.3. Análisis de la recombinación en células NIH-3T3: Generación de estables a la construcción respondedora y análisis de la recombinación

Para la obtención de una línea estable a nuestra construcción, electroporamos el vector p-sps-Luc en la línea celular NIH-3T3. Gracias a la presencia del gen de resistencia a higromicina se seleccionó la población positiva a la construcción, que se transdujo con sobrenadantes virales que permiten expresar las proteínas β -Egfp y β -IRES-Egfp de forma independiente; en ambos casos se obtuvo más de un 90% de transducción (datos no mostrados). Por otra parte el vector control (p-Luc) se transfecó y seleccionó en idénticas condiciones.

En las poblaciones celulares resultantes se analizó la presencia de producto recombinado por medición del análisis de actividad luciferasa. Como se puede observar en la figura 17, los tres extractos muestran una actividad luciferasa muy superior al nivel basal del control, donde se muestra la actividad de las células electroporadas con el p-sps-Luc y transducidas con el vector vacío (pLZRCMV-IRES-Egfp). Los niveles de actividad obtenidos no alcanzaron los del control, lo cual es atribuible a la duración del estudio, insuficiente para producir una completa recombinación, o a la variabilidad en el número de copias del sustrato presentes en cada población.

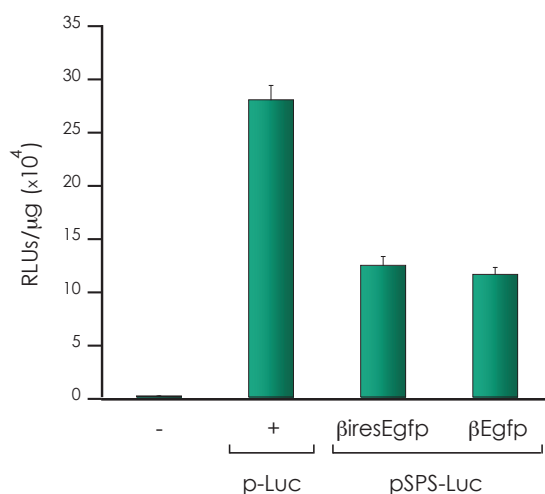


Figura 17. Gráfica comparativa de expresión de luciferasa tras la transducción con los vectores de β -rec o β -Egfp. Estudio inicial del modelo de RAGE. Células NIH-3T3 fueron electroporadas con p-sps-Luc y se seleccionó la población resistente a higromicina, que había integrado la construcción. El pool de células sps-Luc resistentes se infectó con los vectores retrovirales pLZR- β -IRES-Egfp y pLZR- β -Egfp. A las 48h se analizó el nivel de recombinación mediante la cuantificación de la actividad luciferasa. La muestra (-) contiene el mismo pool celular transducido con el vector vacío (pLZR-IRES-Egfp). La muestra (+) contiene un pool celular de células NIH-3T3 electroporadas con el vector p-Luc, resistentes a higromicina.

Cuando analizamos la inducción producida por β -IRES-Egfp frente a la producida por β -Egfp vemos que ambas resultaron similares, siendo ligeramente mayores los niveles obtenidos con la proteína no fusionada. Puesto que los niveles obtenidos con ambas proteínas en estos estudios preliminares resultaron equiparables en todo momento, decidimos continuar este estudio con la proteína de fusión β -Egfp, que nos aportaría una fiabilidad absoluta en el seguimiento de la Egfp y nos orientaría en el desarrollo de nuevas fusiones proteicas.

3.4. Análisis de la recombinación en clones estables al sustrato

Se hacía necesario un estudio más detallado de la recombinación, de modo que procedimos al análisis clonal de las poblaciones que disponíamos. Tras la dilución límite del cultivo celular, que había integrado de forma estable el sustrato de recombinación, se seleccionaron 10 clones para su análisis (C1-C10). Estos clones se transdujeron con sobrenadante viral de la β -Egfp y se procedió a su análisis.

El análisis de la recombinación se muestra en la figura 18: el apartado 18a corresponde al análisis de la recombinación a nivel molecular, donde la PCR muestra cada uno de los clones frente a su control sin β recombinasa. La enzima utilizada fue la *Long Expand* y los oligonucleótidos EF1- α -s y LUCIF-as. La banda de recombinación (400 pb) aparece en casi todos ellos y, aunque también podemos apreciar la banda de no recombinación (1,5 Kb), ésta aparece de forma minoritaria. En paralelo llevamos la medida de luciferasa correspondiente a estos mismos clones; en la figura 18b se aprecia el incremento de la actividad de cada uno de ellos una vez normalizados sus valores; vemos que, aunque todos sufren un incremento de actividad luciferasa, lo hacen de forma heterogénea, probablemente debido al diferente número de copias integradas que presentan. Con

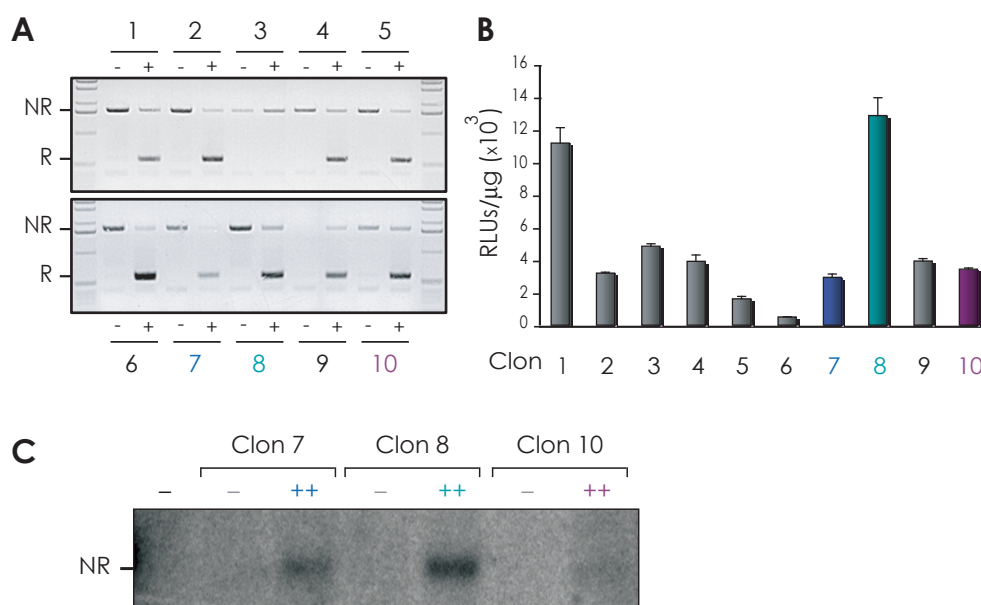


Figura 18. Análisis de la recombinación en clones de células NIH-3T3 que han integrado de forma estable el sustrato sps-Luc. A) Análisis de la tasa de recombinación de 10 clones del sustrato mediante su estudio por PCR. Se destacan tres de ellos (el 7, 8 y 10), que fue con los que se continuó el estudio. Los puntos (-) indican células sin transducir; los puntos (+) indican células transducidas con el vector retroviral pLZR β -Egfp. Se indica la banda de no recombinación (NR) a 1'5 Kb y la de recombinación (R) a 0'4 Kb. **B)** Gráfica comparativa de expresión de luciferasa de los mismos clones; los valores se han normalizado en cada caso respecto a su valor basal. **C)** Análisis por *Southern Blot* de los tres clones seleccionados, para determinar el número de copias de sustrato integradas en cada uno. NR, banda de no recombinación, 1'5 Kb.

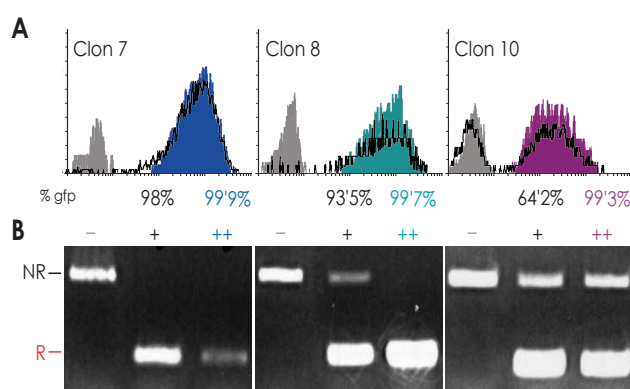
objeto de comprobar esta teoría, seleccionamos tres clones representativos, C7, C8 y C10, previamente a su transducción con los vectores retrovirales, se determinó por *Southern Blot* el número de copias que tenía cada uno. Se empleó como sonda el fragmento de 422 pb purificado tras la digestión del plásmido p-sps-Luc con *SacI*, que nos permite detectar y cuantificar la banda de 1,15 Kb obtenida en la digestión *MluI/NcoI* del ADN. La figura 18c nos muestra que el clon C8 contenía un mayor número de copias que los otros dos, lo cual correlaciona perfectamente con la mayor actividad luciferasa detectada.

Los datos presentados hasta ahora correspondían a poblaciones celulares donde no se había realizado ninguna purificación, de modo que la presencia de producto sin recombinar podía atribuirse a la fracción celular *Egfp*⁻. Con objeto de comprobar esta hipótesis, los tres clones seleccionados se sometieron a un proceso de selección por FACS, determinándose en las poblaciones resultantes (*Egfp*⁺) la tasa de recombinación que presentaban. En las figuras 19a y 19b se muestran, en paralelo, los datos de expresión de *Egfp* y los resultados del análisis por PCR para cada uno de los clones. En los clones C7 y C8, la expresión de *Egfp* antes de la purificación correspondía a un alto porcentaje de la población. En detalle vemos que el clon C7 se presentaba ya totalmente recombinado al inicio del estudio (donde se pasó del 98% de pureza al 99,9%), mientras que en el clon C8, gracias a la selección (donde pasó del 93,5% al 99,7%), lográbamos ver desaparecer completamente la banda de no recombinación, confirmando nuestra hipótesis de trabajo. En el caso del clon C10, la expresión de *Egfp* (y por tanto de β -rec) estaba menos extendida (64,2%), por lo que esperábamos que tras la purificación (99,3%) la banda no recombinada se viese sensiblemente afectada. Sin embargo no se apreció disminución alguna.

Existían tres posibilidades para explicar el fenómeno observado en el clon C10:

- Una o más copias del sustrato no eran susceptibles de sufrir recombinación por hallarse integradas en una zona de la cromatina inaccesible a la β -rec.
- La expresión de la recombinasa no era suficiente para recombinar todas las copias del sustrato.
- La reacción de recombinación se revelaba como un proceso reversible cuyo equilibrio se hallaba en el punto observado.

Figura 19. Análisis de la recombinación en clones estables al sustrato, transducidos con los vectores de β -Egfp y purificados por FACS.



los vectores de β -Egfp y purificados por FACS. **A)** Se muestran los porcentajes de células *Egfp*⁺ tras la transducción de los clones 7, 8 y 10, antes y después de su purificación por FACS. Se detallan los porcentajes de pureza obtenidos en la purificación. **B)** Estudio de la tasa de recombinación por PCR de esos mismos clones en las mismas condiciones. R, recombinado; NR, no recombinado.

3.5. Estudio de la recombinación incompleta del sustrato. Tres posibles razones: Inaccesibilidad del sustrato, insuficiente cantidad de recombinasa y reversibilidad del sistema

Se nos ofrecía de este modo la posibilidad de analizar, en el entorno eucariota, una de las características más notables de la β -rec: su irreversibilidad. Si bien es cierto que,

como se indica en la Introducción, la reacción mediada por la β -rec es irreversible en las reacciones de resolución llevadas a cabo *in vitro* (puesto que no cataliza reacciones de recombinación intermolecular) y que nada hacía suponer que en las células eucariotas esto fuese a ser de otra manera, lo cierto es que no estaba formalmente analizado. Hasta el momento nuestros experimentos se habían focalizado exclusivamente en la detección de producto recombinado tras un corto período de expresión de la recombinasa, con lo que no podíamos asegurar que la reacción no tuviese un carácter reversible apreciable, aunque minoritario.

Con este objeto se generaron varios subclones del clon C10. Realizando en ellos un seguimiento temporal de la reacción, se intentaría determinar la tasa de recombinación en un mismo sustrato con diferentes dosis de recombinasa, puesto que cada célula del clon C10 tendría integrado un número diferente de copias del virus.

Si la inaccesibilidad estática del ADN era la respuesta correcta, en ninguno de los subclones veríamos una recombinación completa, por mucho tiempo que mantuviésemos proliferando el cultivo. Si, por el contrario, el problema era una cantidad insuficiente de proteína, durante el estudio ésta se iría acumulando y acabaríamos teniendo todo el sustrato en su forma recombinada, variando en cada subclon el lapso de tiempo necesario para conseguirlo, en función del nivel respectivo de expresión de la enzima. Respecto a la reversibilidad del proceso, si esto era lo que estaba ocurriendo, lo que veríamos sería un porcentaje variable de recombinación y no recombinación en cada subclon; siempre estarían presentes ambas especies, puesto que en todos los subclones se habría alcanzado un equilibrio intermedio en cuanto a copias en un estado u otro.

Por dilución límite del clon C10 obtuvimos 7 subclones, SC1-SC7, que crecimos hasta alcanzar un número suficiente de células para comenzar el análisis (un mes). Se plaqueó el mismo número de células de cada subclon y se mantuvo el cultivo durante tres semanas. Cada semana aislamos una fracción del cultivo total, donde analizamos la recombinación tanto por PCR como por medición de la actividad luciferasa.

3.5.1. Análisis molecular de la recombinación

Como se puede ver en la figura 20a, el análisis por PCR nos mostró el comportamiento de 5 de esos subclones (los otros dos no llegaron a proliferar lo suficiente y se desecharon). En los subclones SC2 y SC7 se había alcanzado una recombinación completa ya al comienzo del estudio (aproximadamente tras un mes del inicio del estudio); en el subclon SC3 aún no se había alcanzado una completa recombinación, pero se podía apreciar la drástica disminución del sustrato no recombinado; en los subclones SC5 y SC6 la proporción de sustrato no recombinado estaba disminuyendo, aunque a un ritmo más lento.

Esto nos estaba indicando que era la β -rec el factor limitante, pero quisimos verificarlo de forma directa.

3.5.2. Estudio proteico

Determinamos por *Western Blot* la cantidad de β -rec presente en cada uno de los subclones al término de las tres semanas. Podemos ver en la figura 20b que los datos obtenidos reflejaban lo mismo que habíamos visto ya: los subclones SC5 y SC6 presentaban una menor expresión de β -rec. Normalizando los valores para sus respectivos controles de carga (anti-Histona1 y anti-Tubulina, este último no mostrado) concluimos que, tomando como referencia la expresión de β -rec de los subclones SC5 y SC6 y asignándoles un valor numérico arbitrario de 1, los subclones SC3, SC2 y SC7 presentaban una expresión de β -rec de 1,5, 1,8 y 2 veces, respectivamente.

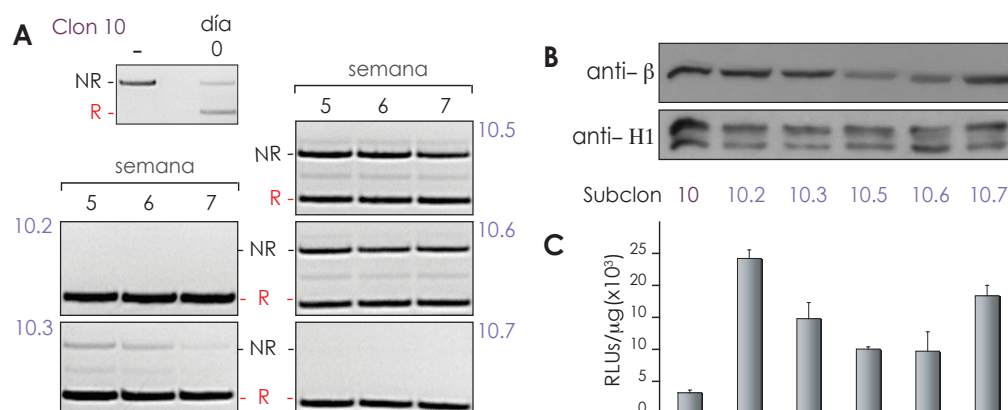


Figura 20. Análisis de la RES en función del tiempo. Se crecieron 7 subclones del clon C10 y se analizó la recombinación de 5 de ellos (10.2, 10.3, 10.5, 10.6 y 10.7) durante 7 semanas. **A)** Se muestran las bandas de recombinación (R) y no recombinación (NR) en el análisis por PCR de la recombinación; el control (-) contiene el clon C10 sin transducir. **B)** Western Blot de los cinco subclones para analizar la expresión relativa de β-rec en cada uno; se añadió anti-histona H1 como control interno. **C)** Actividad luciferasa normalizada de los mismos subclones.

3.5.3. Estudio de la recombinación por análisis de la expresión del gen marcador

El análisis de expresión de luciferasa, mostrado en la figura 20c, se correlacionaba perfectamente con los datos ya expuestos. Los subclones SC5 y SC6 eran los que menor actividad luciferasa presentaban, mientras que el subclon SC3 mostraba una actividad intermedia y los subclones SC2 y SC7 una actividad mayor.

Todos estos datos corroboraban que, de las tres teorías posibles, lo que estaba ocurriendo en el clon C10 era una falta de recombinación por déficit de β-rec, de modo que, como hemos visto, su acumulación en el núcleo celular conllevaba finalmente la completa recombinación del sustrato. No obstante, no se puede descartar definitivamente la opción de inaccesibilidad del sustrato a la recombinasa, de modo que probablemente la ralentización de recombinación observada esté causada por el efecto sinérgico de ambas causas: por un lado, un sustrato de más difícil acceso a la proteína enlentece la recombinación y por otra parte una menor expresión de β-rec hace necesario un mayor lapso de tiempo para llegar a alcanzar la concentración mínima que logre recombinar todas las copias integradas.

4. MODELO INDUCIBLE DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA

Como se ha comentado en la Introducción, los sistemas de recombinación específica de secuencia más ampliamente utilizados (Cre, FLP) han incorporado los modelos inducibles de expresión génica para ofrecer un mayor control y especificidad.

El desarrollo de un modelo inducible para el sistema de β-rec y el análisis de su potencialidad fue, portanto, uno de los objetivos centrales de esta tesis. Barajamos diferentes posibilidades y finalmente optamos por la construcción de unas nuevas proteínas de fusión entre la β-rec y el dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) del receptor de andrógeno (*Androgen Receptor*, AR). En este sistema en estado basal nuestra proteína

permanecería anclada en el citoplasma, y por tanto inactiva, hasta que la administración del ligando provocase su traslocación al núcleo, permitiendo la interacción de la β -rec con su sustrato y con ello su recombinación.

4.1. Desarrollo de las construcciones utilizadas

En nuestro modelo nos propusimos la construcción, como se muestra en la figura 21a, de dos vectores retrovirales que llevaran la fusión de la β -rec al LBD:

pLZR β -LBD-IRES-Egfp, vector bicistrónico codificante por un lado de la Egfp y por otro de la proteína doble β -LBD. Su control no inducible de expresión y actividad, el pLZR β -IRES-Egfp, ya había sido testado previamente y resultaba perfectamente activo y funcional.

pLZR β -Egfp-LBD, que contendría un solo cistrón para una proteína triple β -Egfp-LBD. Su control, el pLZR β -Egfp, también había sido ya analizado y ampliamente utilizado.

Existía en ese momento una única fusión a la β -rec, la cual estaba situada en su extremo carboxi-terminal y, puesto que el LBD se encuentra en el extremo carboxi-terminal del receptor de andrógeno (ver apartado 4 de la Introducción), decidimos realizar la fusión entre el extremo carboxilo de la β -rec y el amino del LBD.

Como sustrato de la reacción utilizamos de nuevo el p-sps-Luc, que ya había sido analizado anteriormente con resultados plenamente satisfactorios (Apartado 3), y que nos permitía un seguimiento de la recombinación por medio del análisis de la expresión del gen marcador luciferasa.

Construcción de la proteína doble (β -LBD-IRES-Egfp):

En el clonaje del pLZR β -LBD-IRES-Egfp, el LBD se obtuvo mediante PCR a partir del plásmido pAdapt.hrtTA-VP16-AR-IRES-Egfp con los oligonucleótidos SAR y ARNN. Éstos poseían en los extremos los sitios de restricción necesarios al clonaje subsiguiente en el pTA-Cloning vector, dando el pTA-S/NN. Una vez comprobado que su secuencia era correcta, se extrajo el LBD con SacII y NotI y se clonó en el p β Egfp, resultando el p β -LBD. Tras asegurarnos de que había quedado en la fase de lectura correcta, el casete β -LBD se purificó tras la digestión secuencial BglII, PvuII y NarI y se clonó en el esqueleto viral pLZRCMV-IRES-Egfp, abierto con BamHI y SfuI, enzimas compatibles con las utilizadas para el inserto, dando el vector pLZR β -LBD-IRES-Egfp.

Construcción de la proteína triple (β -Egfp-LBD):

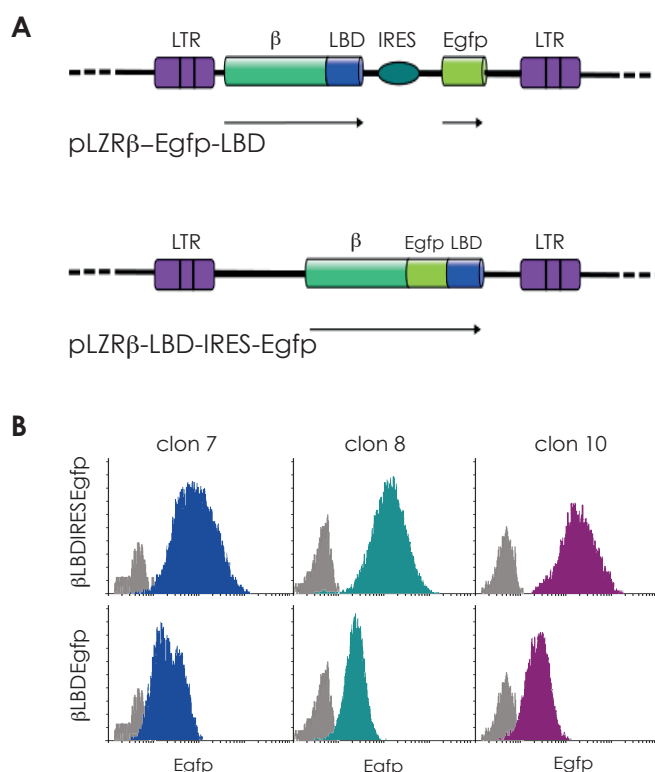
En el clonaje del pLZR β -Egfp-LBD, el LBD se obtuvo mediante PCR a partir del mismo vector parental que en el caso anterior. Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación fueron en este caso BAR y ARNH. Se obtuvo el pTA-B/NH y, tras su verificación por secuenciación, se extrajo el LBD BglII/HindIII y se clonó en el pEgfp-N1, resultando el pEgfp-LBD, que quedaba en la fase de lectura correcta. De aquí se extrajo el fragmento LBD y parte del gen de la Egfp Agel/NotI y se clonó en el p β Egfp, abierto de la misma forma, de modo que el gen de la Egfp quedó reconstituido en el p β -Egfp-LBD; de la digestión y clonaje de este vector intermedio en el pLZRIRES-Egfp (XhoI/NotI) obtuvimos el pLZR β -Egfp-LBD, vector definitivo.

En este modelo nos centramos en el análisis de la recombinación en los clones C7, C8 y C10, sustratos donde ya habíamos comprobado la eficacia del sistema con el vector control pLZR β -Egfp.

Lo primero que hicimos fue evaluar los sobrenadantes virales de las proteínas de fusión doble y triple. En la figura 21b podemos comprobar, tras la purificación por FACS, el nivel de expresión de la Egfp para ambos productos génicos en los distintos clones; vemos que son Egfp⁺ en todos los casos, aunque apreciamos claramente la menor intensidad de la señal correspondiente a la proteína triple respecto a la doble. Estos resultados apuntaban hacia la dificultad intrínsecamente mayor de la célula en la correcta traducción y procesamiento de proteínas de mayor complejidad; aunque no impide totalmente su traducción, disminuye lógicamente su expresión y acúmulo celular.

Figura 21. Generación de un modelo inducible de RES mediado por la β -rec.

A) Estructura de los vectores retrovirales de expresión de la β -rec en las fusiones inducibles generadas. En el pLZR β -LBD-IRES-Egfp se expresan por una parte una proteína doble de fusión, la β -LBD, y por otra la Egfp, la cual se traduce de forma independiente al estar detrás del IRES. En el pLZR β -Egfp-LBD se expresa una única proteína triple de fusión β -LBD-Egfp. Las flechas indican la traducción proteica. **B)** Análisis citométrico de la expresión de Egfp de los dos vectores tras la transducción de células NIH-3T3. Se muestra el nivel de expresión después de la purificación por FACS de la población Egfp⁺.



4.2. Estudio de la actividad: medidas de la recombinación por análisis del gen marcador

Para el análisis preliminar de la recombinación realizamos una serie de experimentos con diversas dosis del ligando (en nuestro caso la mibolerona; mib) y diferentes períodos de exposición al mismo, midiendo la expresión de luciferasa en cada caso. En líneas generales podemos ya apreciar un leve aumento en los niveles de luciferasa a las 24h de inducción tanto en el caso de la proteína doble (Fig. 22a) como en el de la triple (Fig. 22b); tras una inducción más prolongada (48 h, 72 h o 6 días) se observa un incremento mayor, presentando no obstante una variabilidad intrínseca a cada sustrato.

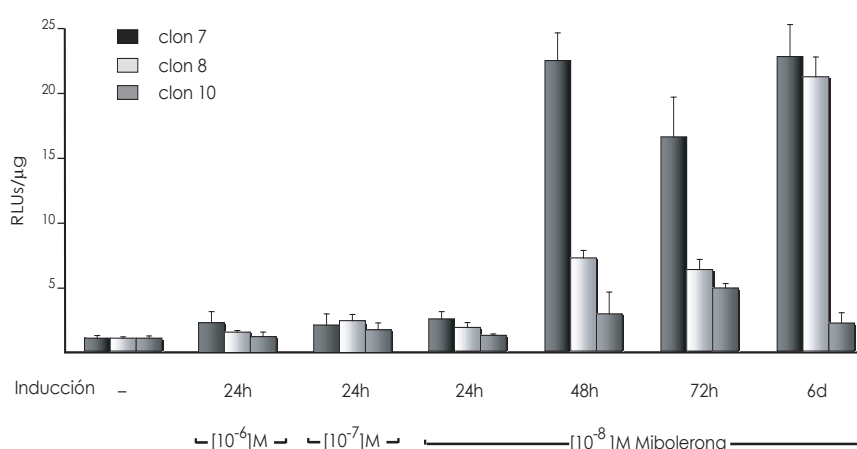
4.2.1. Recombinación en el sistema de la doble proteína de fusión (β -LBD-IRES-Egfp)

En la figura 22a se muestran los niveles de recombinación normalizados obtenidos en las diferentes condiciones de inducción para la proteína doble. Vemos que tras 24 h de inducción los mayores niveles de recombinación se producían a una concentración de ligando de 10^{-8} M. Sin embargo, los valores obtenidos no eran muy elevados, de modo que se prolongó la inducción durante 48h, 72h y 6 días. En estas condiciones hay una inducción sensiblemente mayor, sobre todo en el caso de los clones C7 y C8 donde, a los 6 días de tratamiento, el nivel de actividad de la luciferasa había aumentado más de 20 veces. El clon C10 se mantuvo siempre en unos niveles mucho menores y apenas llegó a incrementar la actividad luciferasa en 5 veces; esto apuntaba de nuevo a su necesidad de un mayor lapso de tiempo que permitiese una acumulación proteica capaz de conseguir la completa recombinación de su sustrato. En cuanto a los valores absolutos obtenidos en la expresión de luciferasa, éstos fueron del orden de 10^3 RLUs/ml, aunque no alcanzaron los niveles obtenidos en el sistema no inducible.

4.2.2. Recombinación en el sistema de la triple proteína de fusión (β -Egfp-LBD)

Respecto a la proteína triple cabe destacar que tras la inducción se alcanzaron unos niveles absolutos de luciferasa mayores que en el caso de la proteína doble, pero también vimos unos niveles basales mucho mayores (en ocasiones mayores que los obtenidos tras la inducción en el sistema doble). Una vez normalizados los resultados, vemos en la figura 22b que los niveles relativos obtenidos en los clones C7 y C8, respecto a su control sin inducir, son mucho menores que en el caso de la proteína doble; aunque siguen aproximadamente el mismo perfil de inducción, el aumento en la actividad luciferasa no llegaba a 10 veces en el caso del clon C7 y era de ~11 veces en el caso del clon C8. En el caso del clon C10, éste seguía presentando los menores niveles de actividad en cualquier condición, pero su inducción era mayor que en el caso anterior, llegando a verse incrementada su actividad luciferasa en más de 6 veces.

A β -LBD-IRES-Egfp



B β -Egfp-LBD

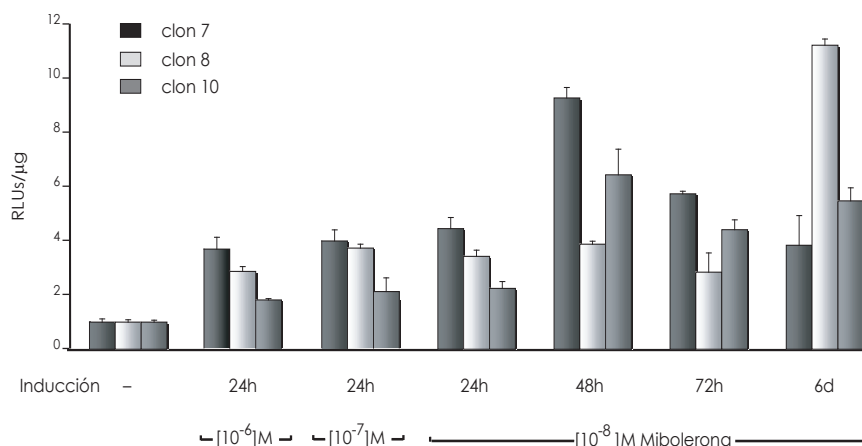


Figura 22. Análisis de la expresión de luciferasa en los sistemas inducibles. En las poblaciones purificadas por FACS se añadió mibolerona, a diferentes concentraciones y durante diferentes tiempos. Los controles (-) contienen las células transducidas pero sin ligando. Todos los datos han sido normalizados para otorgar un valor unitario al control (-) respectivo. **A)** Se muestra la expresión de luciferasa en los tres clones /7, 8 y 10) tras su transducción con el vector retroviral pLZR β -LBD-IRES-Egfp. **B)** Análisis de expresión de luciferasa en los clones que han sido transducidos con el vector pLZR β -Egfp-LBD.

4.3. Evaluación de la inducibilidad mediante el estudio de la expresión y traslocación proteica

Aunque habíamos comprobado la funcionalidad de ambas proteínas, lo cual implicaba que la β -rec alcanzaba el núcleo celular y su sustrato, los niveles alcanzados en la recombinación no eran en ningún caso comparables a los de los controles no inducibles, por lo que quisimos analizar la traslocación proteica como potencial fuente de justificación. Realizamos con los tres clones el ensayo de inducción máxima observada (mibolerona 10^{-8} M durante 6 días) y preparamos tanto las muestras control como las inducidas de manera apropiada al examen (Mats. Y Metds.). En las figuras 23 y 24 se muestran resultados representativos obtenidos con el clon C8, siendo similares a los obtenidos en los otros dos clones.

Los anticuerpos contra la β -rec y el LBD habían sido producidos en conejo (Mats. y Metds.), por lo que para poder realizar el análisis de las tres proteínas hicimos por duplicado las preparaciones celulares; de ese modo en una de ellas analizaríamos la Egfp y la β -rec y en la otra la Egfp y el LBD.

4.3.1. Localización de la proteína doble de fusión (β -LBD-IRES-Egfp)

La figura 23 muestra los resultados obtenidos para proteína doble. En ella vemos como las células, tanto en ausencia como en presencia del ligando, presentan un patrón deslocalizado de Egfp, algo más intenso en el núcleo, pero inalterado por la inducción, puesto que la Egfp es traducida en este caso de forma independiente y no se ve afectada por la retención en el citoplasma debida al LBD. Sin embargo en el caso de la β -rec y el LBD (Fig. 23a y 23b, respectivamente), que conforman la proteína de fusión, éstas muestran una expresión deslocalizada en ausencia del ligando, mientras que tras su administración traslocan claramente al núcleo celular.

Esta figura muestra dos aspectos importantes a destacar. En primer lugar, se aprecia que la señal nuclear de β y LBD en las células que no habían recibido inducción era menor en intensidad y diferente en distribución respecto a las células que si la habían recibido; esto es importante porque el patrón de la β -rec en su forma activa corresponde mayoritariamente a agregados cromatínicos y esto no ocurría en las células no inducidas, en las cuales,

aunque una pequeña fracción estuviese llegando al núcleo, no lograba formar el complejo de reacción con su sustrato.

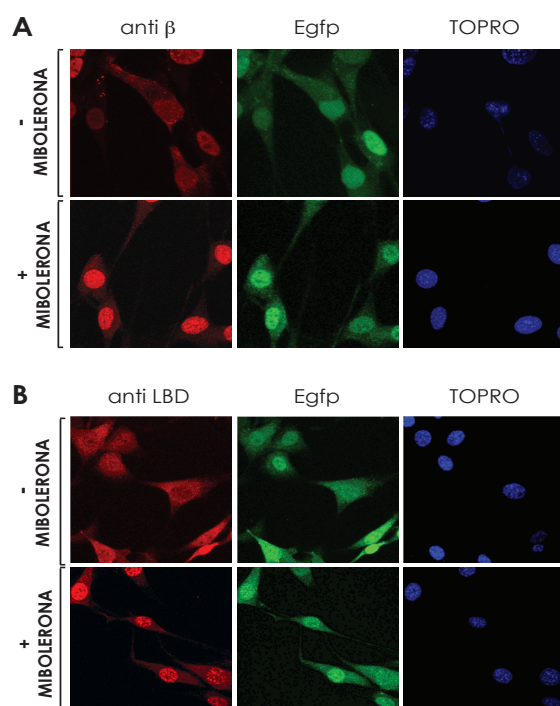


Figura 23. Análisis inmunofluorescencia de la localización de la proteína doble, β -LBD, y de la Egfp; estudio de su comportamiento en presencia de ligando (mibolerona). A) Tinción con el anticuerpo anti- β . **B)** Tinción con el anticuerpo anti-LBD. En ambos casos el segundo panel muestra la autofluorescencia de la Egfp y el tercero muestra la tinción de ADN (TOPRO).

Por otra parte veíamos que la traslocación al núcleo tras la inducción no era completa, pues aún se podía apreciar una pequeña fracción en el citoplasma celular; esto implicaba que el sistema no estaba funcionando de manera óptima y que parte de la β -rec se encontraba aún en su forma inactiva. En todo caso el modelo mostraba una respuesta (\pm mib) de la proteína de fusión β -LBD muy destacable.

4.3.2. Localización de la triple proteína de fusión (β -Egfp-LBD)

La figura 24 muestra las imágenes correspondientes a la triple proteína de fusión, β -LBD-Egfp. En ellas vemos como los tres componentes colocalizan perfectamente. La administración del ligando provoca en este caso la completa traslocación al núcleo celular; esto corroboraría los datos anteriormente descritos en relación a los mayores niveles de recombinación absolutos alcanzados, puesto que toda la β -rec habría entrado en el núcleo y se encontraría en su forma activa. Sin embargo, nos encontramos con que en ausencia de ligando ya encontramos en el núcleo una fracción importante de la proteína; además, su patrón de localización nuclear era semejante al de la proteína en su forma activa, de modo que lo que estábamos observando explicaba el elevado nivel basal, el escape de la regulación que veíamos en estas células.

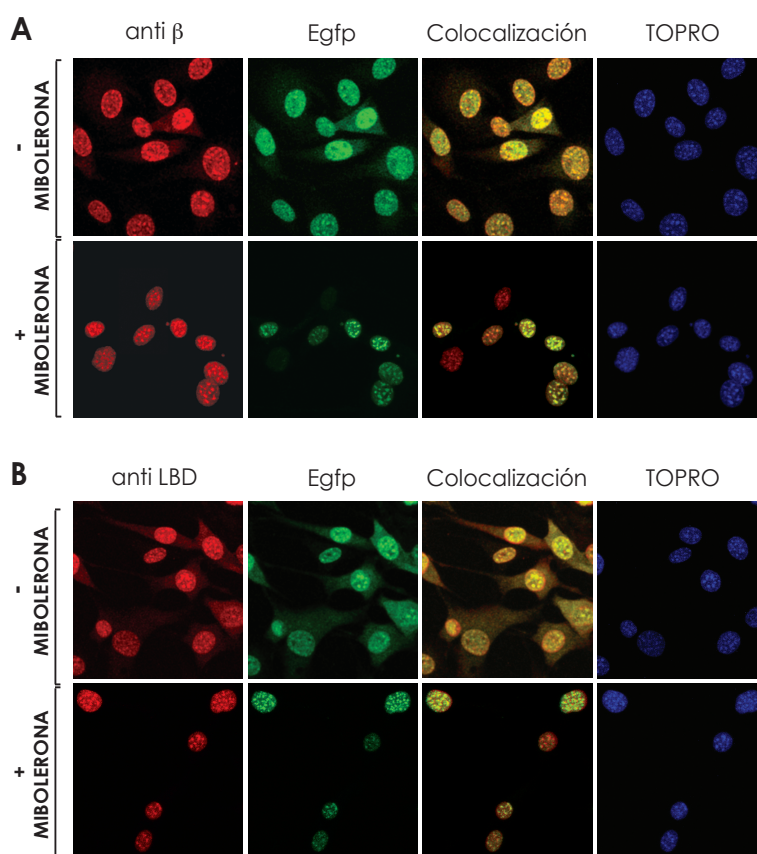


Figura 24. Análisis por inmunofluorescencia de la localización de la proteína triple, β -Egfp-LBD; estudio de su comportamiento en presencia de ligando (mibolerona).

A) Tinción con el anticuerpo anti- β . **B)** Tinción con el anticuerpo anti-LBD. En ambos casos se muestra la autofluorescencia de la Egfp y cómo ésta colocaliza con la β -rec y el LBD. Se muestra la tinción de ADN (TOPRO).

4.4. Estudio de la expresión por Western Blot

Aunque los datos aportados por inmunofluorescencia explicaban en gran medida los resultados funcionales observados en los dos modelos, quisimos confirmar los niveles de expresión proteica por Western Blot. Para ello hicimos por duplicado los geles de los tres clones, con extractos de los sistemas doble y triple, con y sin ligando; el hacerlos por duplicado respondía a la misma razón que en el caso de la inmunofluorescencia.

En la figura 25 se muestran los resultados correspondientes al clon C8 como ejemplo representativo, empleando la tubulina como control interno; los otros dos clones mostraron

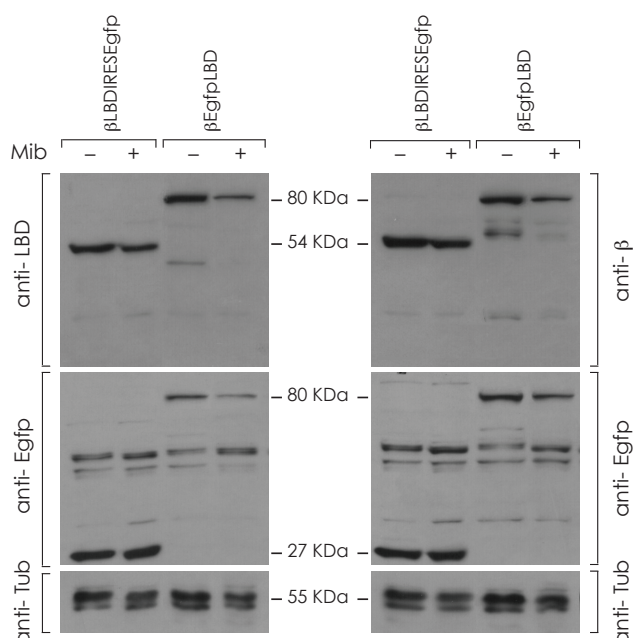
un comportamiento similar. Los anticuerpos empleados (anti- β , anti-Egfp y anti-AR(LBD)) mostraron las bandas correspondientes en cada caso a la movilidad electroforética esperada (β -AR 54 kDa, Egfp 27 kDa, β -Egfp-AR 80 kDa). Sin embargo, lo que también se apreciaba claramente era la disminución en intensidad (y por tanto en cantidad) de las proteínas que formaban parte de las fusiones tras la administración del ligando en relación a sus niveles en ausencia del mismo.

En el caso de la Egfp se aprecian ciertas bandas inespecíficas al anticuerpo empleado, pero estas no impiden la detección de las nuestras: en el caso de la triple fusión la Egfp se ve disminuida en presencia del ligando en igual medida que la β -rec y el LBD, mientras que en el modelo doble, donde su traducción transcurre de forma independiente, mantiene unos niveles equivalentes al control no inducido; éste es un dato muy significativo al tratarse de un control interno al sistema.

Una vez normalizados, los datos indicaron que en el caso de la proteína doble la cantidad de ésta en presencia del ligando se veía disminuida en un 30%, no viéndose afectada la Egfp. En el caso de la proteína triple, la disminución, en este caso de sus tres componentes, era aún más pronunciada, llegando a un descenso del 50%. Los resultados del clon C8 se reprodujeron en los clones C7 y C10, lo que alejaba la posibilidad de un error experimental.

Figura 25. Análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas doble y triple, antes y después de la adición del ligando.

Análisis de células NIH-3T3 transducidas con los vectores pLZR β -IRES-Egfp o pLZR β -LBD-Egfp y purificadas (Egfp+) por FACS. Las pruebas se hicieron por duplicado para poder realizar el análisis en paralelo con los anticuerpos correspondientes. Los puntos (-) indican las células no tratadas con mibolerona. Los puntos (+) indican las células tratadas con mibolerona (10^{-8} M durante 48h). Como control interno se utilizó la tubulina. Se muestran los pesos moleculares de las proteínas de interés: β -LBD (54 KDa), Egfp (27 KDa), β -Egfp-LBD (80 KDa) y Tubulina (55 KDa).



PARTE II: MODELOS *IN VIVO*

La aplicación de mayor utilidad del sistema de recombinación de la β -rec se asocia con su utilización en modelos animales. Los modelos de transgénesis y KO condicionales están siendo ya ampliamente utilizados por numerosos equipos de investigación de todo el mundo como herramientas de trabajo habituales. Sin embargo, salvo los contados casos en que se utiliza alguna otra recombinasa, la elección recae invariablemente en Cre o FLP. Nosotros nos propusimos el desarrollo de un sistema complementario, alternativo, que no permitiese los reordenamientos intermoleculares no deseados que en ocasiones catalizan Cre y FLP. Esperábamos demostrar su funcionalidad y potencialidad en los modelos de experimentación murinos.

El modelo de transgénesis a la β -rec

Contábamos con la existencia de una línea murina transgénica a la β -rec (Díaz, 2000). En él, la expresión de la proteína quedaba restringida a las células T, único linaje donde el promotor bajo el cual se encontraba, el promotor proximal del gen Lck (Lymphocyte protein tyrosine kinase), era activo (Figs. 26a y 26b) (Wildin et al., 1991). Tras el gen de la β -rec se encuentra el gen de la hormona de crecimiento humana (hGH), que provee de la señal de poliadenilación (Garvin et al., 1990). En el estudio de estos ratones se confirmó que la expresión quedaba restringida al timo y al bazo (Fig. 26c). Que dicha proteína era activa quedó también de manifiesto en los ensayos de recombinación *in vitro* (RIV) realizados con extractos tímicos de animales transgénicos (Fig. 26d).

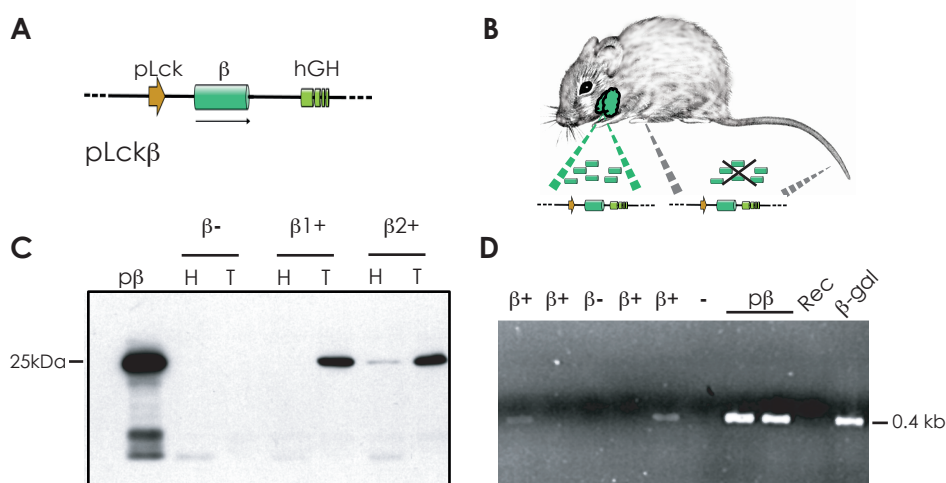


Figura 26. Características de la línea murina transgénica a la β recombinasa (Tg β). **A)** Esquema de la construcción empleada. El gen de la β -rec está bajo el control del promotor proximal del gen Lck. **B)** Representación de la expresión condicional de la β -rec de forma exclusiva en timo. El resto del organismo tendrá el gen de la β -rec, pero no se expresará. **C)** Extractos de timo (T) e hígado (H) de dos ratones transgénicos (β 1 y β 2) y un control wt (β -). El análisis busca demostrar la presencia de β -rec (25 kDa); como control se añadieron 5 ng de β -rec pura (p β). **D)** Para evaluar la actividad de la β -rec se analizaron extractos crudos de timo de animales transgénicos (β +) y wt (β -) con el pRECOMBINER como sustrato. Tras la reacción de recombinación se buscó el producto recombinado mediante su amplificación por PCR (0'4 Kb). Al control (-) no se le añadió β y al control p β (+) se le añadió β -rec purificada. Como controles adicionales REC incluye sólo el plásmido sustrato y β -gal el plásmido sustrato recombinado *in vitro*.

El paso siguiente era por tanto la obtención de una línea murina respondedora, la cual se cruzaría con la transgénica a la β -rec generando una descendencia doble transgénica en la que poder analizar el proceso de recombinación específica de secuencia.

Por otra parte sabíamos que dicha recombinación iba a tener lugar exclusivamente en las células T y que los vectores retrovirales habían demostrado tener una alta infectividad en linfocitos T humanos (Abad et al., 2002); con esto se nos ofrecía la posibilidad de un estudio complementario de los vectores retrovirales de β probando su utilidad en la transducción de una línea celular primaria: los linfocitos T murinos obtenidos de nuestros ratones sustrato.

Los modelos murinos respondedores

Nos propusimos desarrollar dos líneas respondedoras; de ellas una constituiría una línea transgénica al sustrato de reacción (Tgrec) y la otra consistiría en una variante de KO condicional (KOsix) en el que habríamos sustituido un fragmento génico determinado por nuestro casete sustrato de la recombinación.

5. MODELO DE TRANSGÉNESIS AL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN

El primero de nuestro modelos consistía por tanto en la generación de una línea murina transgénica al sustrato de recombinación (Tgrec). En el casete incluiríamos un gen marcador de expresión condicional a la recombinación (*LacZ*), lo que nos permitiría analizar, de manera relativamente sencilla, la eficacia de la reacción en el entorno murino.

5.1. Construcción del vector sustrato y verificación de la capacidad de recombinación por recombinación *in vitro* y por análisis del gen marcador

En la construcción del vector utilizamos como esqueleto el plásmido pLck-hGH, el mismo que portaban los transgénicos β . Gracias a esta doble regulación, los animales doble transgénicos, llevando integrada la construcción en todas las células del organismo, únicamente la deberían recombinar y expresarían el gen marcador en el linaje de linfocitos T.

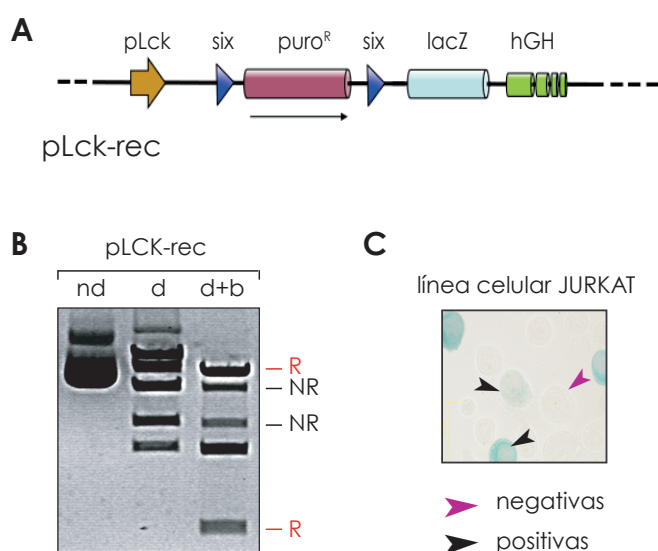
En la figura 27a vemos el resultado del proceso: en el sitio BamHI del vector pLck-hGH se introdujo un vector sintético que le proveía de los sitios de restricción Sse8387I y SgrAI. Como sustrato de recombinación se utilizó el casete sps-LacZ del pRECOMBINER, puesto que ya había dado resultados satisfactorios. Sacamos dicho casete con las enzimas descritas y tras la ligación obtuvimos el vector deseado, el pLck-rec, en el que el fragmento a recombinar (sps) estaba situado tras el promotor Lck y delante del gen marcador *LacZ*; en el extremo 3' del vector se hallaba el gen de la hormona del crecimiento humano (hGH), que proporcionaba la región de poliadenilación necesaria para la expresión de nuestro gen marcador y que además nos permitiría realizar el genotipado murino. Esta construcción es similar a la utilizada previamente para el sistema Cre/loxP (Orban et al., 1992).

Los clones que por análisis de restricción resultaron correctos se secuenciaron, y con los positivos se realizó un experimento de recombinación *in vitro* que asegurase su funcionalidad; en la figura 27b se muestra el resultado del clon que se utilizó finalmente en la microinyección, donde vemos, tras la digestión del ADN genómico con SacII, las bandas correspondientes a los productos de la recombinación específica de secuencia (1 Kb y 9 Kb), así como las de los fragmentos no recombinados (3,6 Kb y 6,3 Kb), las cuales no llegan a desaparecer completamente. También se aprecia una banda a 2,7 Kb, común a los dos estados del sustrato, no recombinado y recombinado. Una vez que sabíamos que el vector construido era capaz de ser recombinado, y antes de generar la

línea murina que lo portaría, analizamos la recombinación en la línea celular Jurkat. Se trata de una línea de linfoma T humano, por lo que el promotor Lck se encontraría activo. Electroporamos el vector pLck-rec y seleccionamos las células portadoras por su resistencia a puromicina; éstas se transdujeron con sobrenadante viral para la β -Egfp pero, tras una tinción estándar para la β -galactosidasa (Mats. Y Metds.), apenas fue visible su coloración citoplasmática característica. Esperábamos ver que las células cogían el tono azulado típico de la β -galactosidasa, pero su ausencia podía ser debido a una baja eficiencia de la electroporación del sustrato, de la transducción retroviral de la β -rec, de la reacción de recombinación en sí, o de las tres cosas a la vez, lo cual daría como resultado una bajísima expresión del gen marcador, no suficiente para su observación directa.

Otra opción era que el gen de *LacZ* estuviese mutado o no pudiese expresarse correctamente, pero su funcionalidad quedó demostrada tras electroporar los productos de la reacción de RIV en la línea celular Jurkat. Como podemos ver en la figura 27c, a las 48h pudimos ver claramente la tinción azul de la β -galactosidasa.

Figura 27. Generación de la línea murina transgénica al sustrato de recombinación (Tgrec): modelo de RAGE condicional a la actividad de la β -rec. **A)** Esquema de la construcción empleada (pLck-rec). El promotor proximal del gen Lck (pLck) dirige la expresión del casete six-puro^R-six. De forma condicional a la recombinación (RAGE) se expresaría el gen *LacZ*. **B)** RIV del vector pLck-rec para demostrar su capacidad de recombinación. Todas las muestras



5.2. Microinyección, obtención y establecimiento de líneas murinas portadoras del transgen

Los animales transgénicos fueron obtenidos mediante la microinyección en pronúcleos de óvulos fertilizados (ver Introducción) del fragmento resultante de la digestión del plásmido pLck-rec con *SacII*. De esta forma se obtuvieron 46 animales, de los cuales solamente 2 (H#6 y M#13) portaban el transgen integrado en el genoma y lo transmitieron en su línea germinal, generándose las líneas correspondientes a ambos transgénicos.

Aparecen en la figura 28a las estrategias, tanto por PCR como por *Southern Blot*, que fueron utilizadas en la detección de los animales transgénicos. Los oligonucleótidos empleados en la PCR fueron hGH-3 y hGH-4, que generan una banda de 415 pb en los

animales positivos a la construcción. Las enzimas de corte del ADN genómico para el *Southern Blot* fueron NcoI/EcoRV, y la sonda (353 pb) fue obtenida con la digestión HindIII/SauI del pLck-rec; La digestión NcoI/EcoRV da una banda de 1,7 Kb en los animales transgénicos (NR). El resultado del *Southern Blot* nos muestra (Fig. 28b) que la línea H#6 presentaba ~15 copias del transgen y la línea M#13 ~3. Estos valores se mantuvieron en la descendencia, lo que nos indicaba que las copias se hallaban genéticamente ligadas.

También la figura 28a nos muestra los oligonucleótidos utilizados en el análisis de la recombinación del sustrato, tanto en líneas primarias de ratones Tgrec transducidas con β -rec como en los doble transgénicos Tgrec/Tg β . Los oligonucleótidos son LCKp y LacZ-2, y nos permiten la detección del sustrato tanto en su forma no recombinada (NR, 2,7 Kb) como en la recombinada (R, 1,6 Kb).

El análisis por *Southern Blot* del ADN genómico mencionado permite por su parte no sólo la detección de la banda no recombinada (NR, 1,7 Kb), sino también la de la banda recombinada (R, 3,8 Kb)

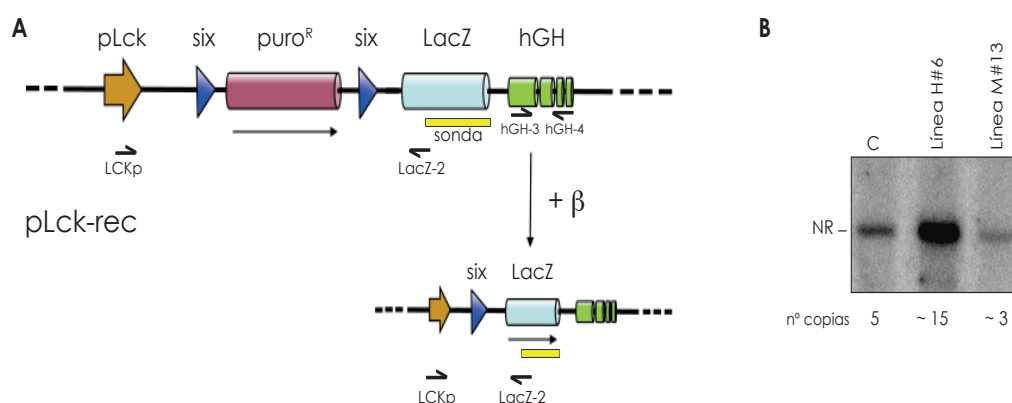


Figura 28. Análisis de la línea murina transgénica al sustrato de recombinación (Tgrec). **A)** En el esquema de la construcción empleada (pLck-rec) se ha señalado la posición de la sonda (obtenida de la digestión HindIII/SauI del pLck-rec) que se ha utilizado tanto para el genotipado de los animales transgénicos como para el análisis de la RES; también puede verse la posición de los oligonucleótidos empleados en el genotipado (hGH-3 y hGH-4) y en el análisis de la RES (LCKp y LacZ-2). **B)** Estimación del número de copias del casete integradas en las dos líneas murinas transgénicas generadas (H#6 y M#13). En el control (C), utilizado como referencia, se han añadido 5 copias del transgen.

5.3. Análisis fenotípico y estudio citométrico de las poblaciones linfocitarias

Los animales transgénicos en heterocigosis (ht) no han mostrado diferencias con los silvestres (wt) en cuanto al tamaño, fisiología interna o longevidad, ni presentan anomalías en cuanto a fertilidad o al tamaño de las camadas. A pesar de no disponer de animales homocigotos y de que los que se hallaban en heterocigosis tendrían probablemente rescatado fenotípicamente cualquier defecto genético que hubiese provocado la inserción del transgen, quisimos analizar en mayor detalle si las poblaciones linfocitarias habían sido afectadas.

Para ello realizamos el estudio de los marcadores básicos del linaje linfóide en los tres órganos de mayor presencia linfocítica, como son el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. En la figura 29 quedan reflejados los datos obtenidos, pudiéndose concluir que tanto la relación entre linfocitos B y T como las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ mantenían unos niveles fisiológicos normales.

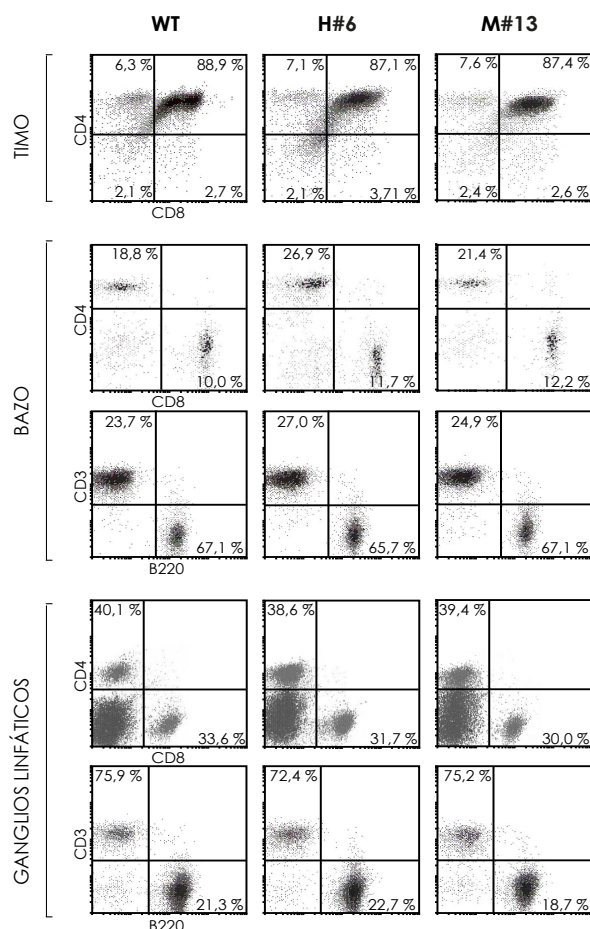


Figura 29. Análisis citométrico de las poblaciones linfocitarias de animales wt y transgénicos Tgrec (heterocigotos). Se muestran resultados representativos de ratones wt (hermanos de camada no transgénicos) y de cada una de las dos líneas transgénicas (Tgrec) generadas, H#6 y M#13. No se observan alteraciones en las poblaciones de linfocitos derivadas de la presencia del transgen, ni en timo ni en órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos). Poblaciones analizadas en timo, CD4/CD8; poblaciones analizadas en bazo y ganglios linfáticos, CD4/CD8 y CD3/B220.

5.4. Infección con la β recombinasa de linfocitos T primarios: Análisis de la expresión proteica y estudio de la recombinación

Como se ha mencionado anteriormente, nos interesaba también disponer de una fuente de células primarias en las que testar los vectores retrovirales de la β -rec. Para ello purificamos los linfocitos T del bazo de animales transgénicos al sustrato de recombinación y los transdujimos con sobrenadantes virales de los vectores pLZR- β -IRES-Egfp y pLZR- β -Egfp (ver Mats. y Metds.).

Estudiamos en primer lugar la localización celular de ambas proteínas por inmunofluorescencia. En la figura 30 vemos que la β -rec mantenía en ambos casos su localización nuclear típica; la Egfp también presentaba el patrón esperado, nuclear o deslocalizado, en el caso respectivo de hallarse o no fusionada a la β -rec.

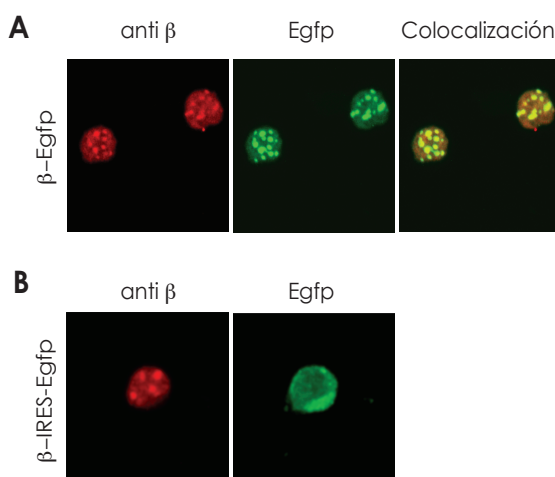


Figura 30. Localización de la β -rec en linfocitos T primarios transducidos con los vectores retrovirales pLZR- β -Egfp y pLZR- β -IRES-Egfp. A) Tras la transducción con el pLZR- β -Egfp se observa perfectamente la colocalización de la β -rec y la Egfp en forma de agregados nucleares. **B)** Tras la transducción con el vector pLZR- β -IRES-Egfp, la β -rec mantiene su localización nuclear, pero la Egfp muestra una distribución dispersa por el reducido citoplasma.

Los datos obtenidos por inmunofluorescencia apuntaban a que ambas proteínas se estaban sintetizando de forma correcta y eran activas. Por otra parte, como el estudio de recombinación requería de un mayor número de células, decidimos realizar dicho análisis exclusivamente con la proteína de fusión β -Egfp. Para ello transdujimos de nuevo las células T purificadas del bazo de animales transgénicos con el pLZR β -Egfp y analizamos por PCR la tasa de recombinación que presentaban; se emplearon la polimerasa *Long Expand* y los oligonucleótidos LCKp y el LacZ-2 (Fig. 28a). En la figura 31a se muestran los datos de la transducción, donde se alcanzó un porcentaje de positividad para la Egfp del 30,7%. La PCR reveló (Fig. 31b), aunque poco intensa, una banda clara a la altura de recombinación (1,6 Kb). Se detectó también una banda muy tenue a la misma altura en los controles del experimento. No podíamos asegurar que fuese una banda inespecífica puesto que apareció en todas las ocasiones en que se repitió el análisis, incluso cambiando las condiciones de la PCR, pero al aparecer también en la muestra de ADN de tejido de cola del animal, no era posible que fuese de recombinación específica de secuencia, pues no es un tejido de expresión de la β -rec.

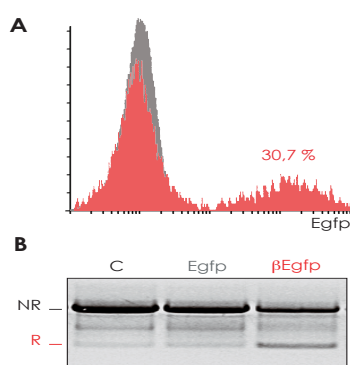


Figura 31. Análisis funcional de la actividad β -rec en linfocitos T primarios de animales Tgrec. A)

Transducción de linfocitos T esplénicos de ratones Tgrec (heterocigotos) con el vector retroviral pLZR β -Egfp. **B)** Análisis de la recombinación por PCR en los linfocitos T infectados y purificados por FACS (β Egfp). Como control se utilizaron las mismas células sin transducir (Egfp); el ADN procedente de la cola del mismo animal se utilizó como control adicional (C); los oligonucleótidos LCKp y LacZ-2 permiten visualizar la fracción recombinada (R) a 1'6 Kb, y la no recombinada (NR) a 2'7 Kb.

5.5. Análisis de la recombinación en ratones doble transgénicos al sustrato y a la β recombinasa

En la obtención de los ratones doble transgénicos realizamos cruces entre los animales de las dos líneas respondedoras que habíamos generado (H#6 y M#13) y los ratones transgénicos a la β -rec. Puesto que no disponíamos de ejemplares homocigotos ni al sustrato ni a la β -rec, los positivos a ambas construcciones fueron escasos. En el genotipado de los animales doble transgénicos, al no poder determinar la homocigosis del animal utilizando los oligonucleótidos hGH-3 y hGH-4 (puesto que ambas líneas portaban el gen hGH) se emplearon otras dos parejas que lograban el genotipado de forma independiente: LACUP/LACLO para detectar los animales positivos al sustrato (729 pb) y BETAsens/BETAantisens para detectar los transgénicos a la β -rec (600 pb). Las muestras se analizaron en una única reacción de PCR.

En la figura 32 se ha representado de forma gráfica el fenotipo que iban a presentar los animales doble transgénicos (Tgrec/Tg β); restringido a los linfocitos T del timo, bazo y ganglios, aparecería nuestro casete en su forma recombinada, mientras en el resto del organismo éste se mantendría no recombinado. Las muestras utilizadas en el análisis van variando en los sucesivos pasos del estudio, pero siempre dispusimos como control de muestras obtenidas de un hermano de camada transgénico únicamente al sustrato (Tgrec).

En los sucesivos pasos del análisis, éste se llevó a cabo mediante PCR, con los oligonucleótidos LCKp en sentido 5' y LacZ-2 en sentido 3' los cuales, como hemos visto, permitían la cuantificación del proceso.

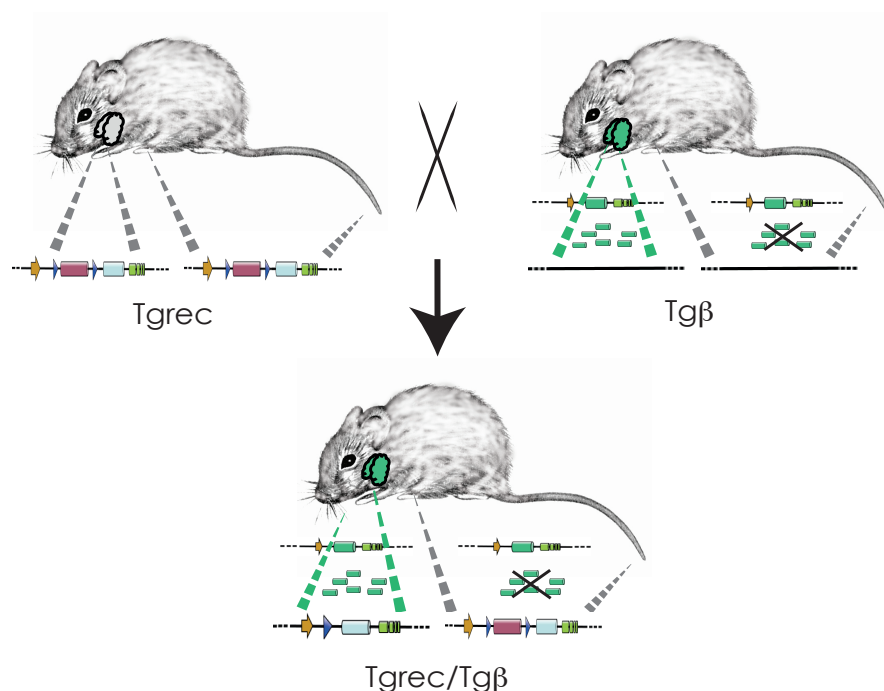


Figura 32. Representación del fenotipo de las dos líneas murinas progenitoras, la transgénica al sustrato, (Tgrec), y la transgénica a la β -rec (Tg β) y de la línea murina doble transgénica (Tgrec/Tg β). Se indica tanto el estado del sustrato (recombinado, R, o no recombinado, NR) como la expresión de la β -rec, simbólicamente restringida al timo, aunque también se expresa en menor medida en bazo y ganglios.

5.5.1. Análisis de la recombinación en timo, órganos linfoides secundarios y poblaciones linfocitarias parcialmente purificadas

5.5.1.1. Estudio en órganos totales

En primer lugar quisimos verificar la funcionalidad del modelo. Para ello se utilizaron los órganos totales para la realización de los análisis de expresión proteica y recombinación. En el análisis proteico (Fig. 33a) confirmamos que la expresión de la β -rec quedaba, efectivamente, restringida a los órganos de interés. Aparecía además una banda de peso molecular ligeramente inferior; dicha banda resultó ser inespecífica, puesto que también apareció en los animales control.

En cuanto al análisis de la recombinación (Fig. 33b), éste mostró inequívocamente la presencia de la banda de recombinación específica de secuencia en los tejidos de expresión de la β -rec, donde la banda de no recombinación se encontraba claramente afectada. En los demás órganos de los animales doble y en los de los animales control la banda de recombinación no resultó detectable.

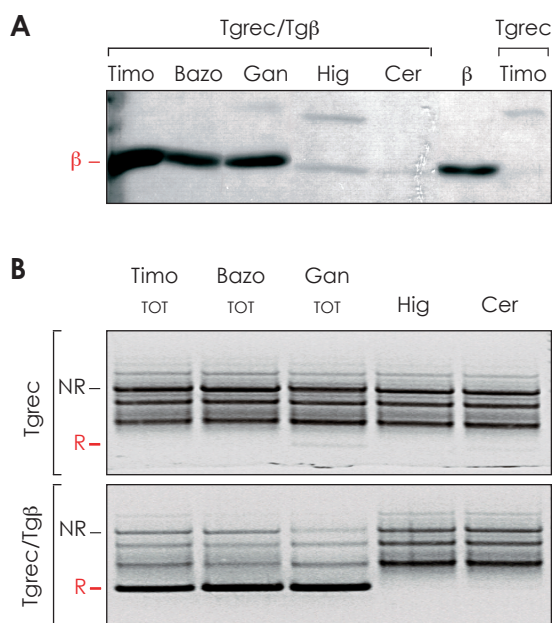


Figura 33. Análisis preliminar de la RES en la línea murina doble transgénica Tgrec/Tgβ. A) Expresión selectiva de la β -rec (25 kDa; β) en un animal doble transgénico (Tgrec/Tgβ). Se analizaron 20 mg de extracto de timo, bazo, ganglios (Gan), hígado (Hig) y cerebro (Cer) de ratones Tgrec/Tgβ y 20 mg de timo de ratones Tgrec. Como control se añadieron 2ng de β -rec purificada. **B)** Análisis representativo de la recombinación en órganos completos (sin purificar las diferentes poblaciones linfocitarias que contienen) de la línea doble Tgrec/Tgβ y la línea sustrato Tgrec (control). El análisis se ha realizado por PCR y se han utilizado los oligonucleótidos LCKp y LacZ-2, señalándose la altura respectiva de la banda de recombinación (R, 1'6 Kb) y no recombinación (NR, 2'7 Kb).

5.5.1.2. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos B

Para realizar un estudio más detallado de las distintas poblaciones linfocitarias seguimos diversos protocolos de enriquecimiento celular. Disponíamos de un método sencillo de purificación de células B de bazo (ver Mats. Y Metds.) que, de forma indirecta, enriquecía nuestra población de linfocitos T, por lo que lo empleamos en primer lugar.

Como vemos en la figura 34a, en el animal doble transgénico se observaba claramente la banda de recombinación en los órganos de interés, siendo la proporción entre la fracción recombinada y la no recombinada sensiblemente mayor en el caso del bazo y los ganglios que en el timo. En los órganos de no expresión de la β (hígado y cerebro) y al animal control, no se detectó la presencia del sustrato en su forma recombinada.

En el análisis anterior habíamos demostrado que el enriquecimiento en linfocitos B conllevaba una disminución de la banda no recombinada en el bazo; esto era lógico, puesto que lo que hacíamos era retirar células que no habían recombinado. Sin embargo, al tratarse de un método de enriquecimiento de células B, éste contaminaba la fracción correspondiente a los linfocitos T con los demás tipos celulares presentes en esos órganos e incluso una pequeña fracción de linfocitos B. Esperábamos que esa fuese la razón de que no se hubiese dado una recombinación completa, por lo que nuestro siguiente paso fue el enriquecimiento de las muestras en linfocitos T.

5.5.1.3. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos T totales

Los linfocitos T fueron enriquecidos mediante separación magnética (ver Mats. y Metds.) y quedaron con una contaminación por otros tipos celulares teóricamente muy baja (2 - 8%). En este caso eran los linfocitos B los que estaban significativamente más contaminados por sus homólogos T, por lo que no nos extrañó la presencia de banda recombinada en su fracción (Fig. 34b). En cuanto a los linfocitos T, seguíamos sin haber logrado alcanzar una recombinación completa, aunque no sabíamos si aún era por problemas de contaminación celular o por problemas de inaccesibilidad de alguna de las copias del sustrato.

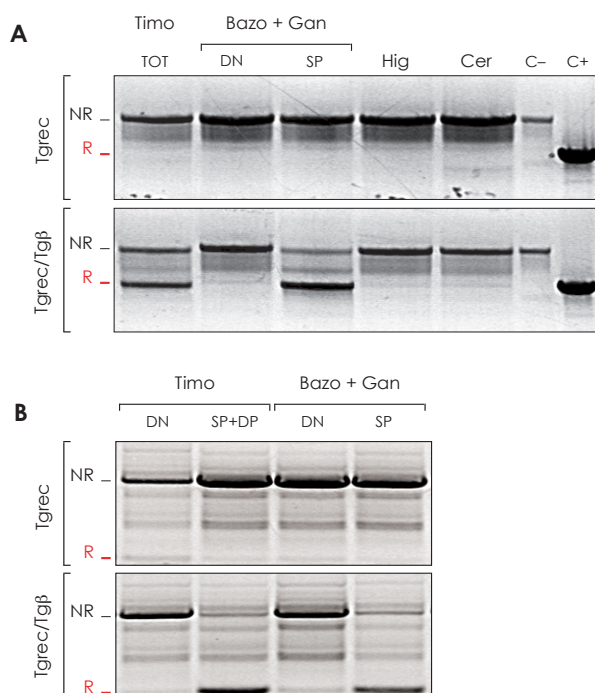


Figura 34. Análisis de la RES en poblaciones linfocitarias parcialmente enriquecidas de la línea murina doble transgénica Tgrec/Tgβ.

Análisis realizado por PCR. R, banda de recombinación (1'6 Kb); NR, banda de no recombinación (2'7 Kb). **A)** Enriquecimiento de linfocitos B de bazo de animales dobles transgénicos (Tgrec/Tgβ). Como controles se utilizaron el hígado (Hig) y cerebro (Cer) obtenidos del mismo animal; como controles adicionales se usaron 5 pg de pLckrec (C-), y 5 pg del pLckrec recombinado por RIV y purificado (C+). En bazo y ganglios la fracción DN corresponde a los linfocitos B enriquecidos y la fracción SP a todos los demás tipos celulares. El timo se analizó como un todo, sin separar poblaciones. **B)** Enriquecimiento de linfocitos T de animales dobles Tgrec/Tgβ. En las fracciones celulares de timo la población DN corresponde a linfocitos CD4⁺/CD8⁻, la DP a CD4⁺/CD8⁺ y la SP a

CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁺. En esta etapa del análisis no se discrimina entre linfocitos T tímicos DP y SP, ambas fracciones celulares se encuentran en la misma muestra. En bazo y ganglios la fracción SP corresponde a los linfocitos T SP enriquecidos y la fracción DN corresponde a todos los demás tipos celulares.

5.5.2. Análisis de la recombinación en poblaciones de linfocitos T altamente purificadas

Para ello realizamos un análisis donde se purificaron los linfocitos T por FACS. De esta manera nos asegurábamos de que la población purificada no tuviese contaminación por parte de ningún otro tipo celular y además esta separación iba a permitirnos el análisis individualizado de los linfocitos T DP (CD4⁺/CD8⁺) y los SP (CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺). En bazo y ganglios esta diferenciación no era significativa, puesto que solo poseen células T SP. Sin embargo, en el timo, donde maduran, se encuentran tanto SP como DP, por lo que resultaba interesante determinar si existían diferencias entre ellas en cuanto a sus tasas de recombinación.

5.5.2.1. Estudio de la recombinación por PCR

La figura 35a muestra el resultado del análisis, donde podemos comprobar que mientras que en el bazo y los ganglios en la población SP seguíamos con una tasa de recombinación muy alta, pero sin alcanzar una recombinación completa, en los linfocitos T de esos mismos órganos mantenidos en cultivo durante 5 días (LTact) sí se alcanzaba. Esto nos indicaba que la β-rec había logrado acceder a todas las copias y recombinarlas, siendo necesario para ello la activación y proliferación celular. En el timo veíamos recombinación en ambas poblaciones celulares (SP y DP), pero la diferencia en el porcentaje de recombinación quedaba en claro manifiesto: mientras en las células DP la banda predominante era la no recombinada, en las SP lo era la recombinada, apuntando a la relación entre la etapa de maduración celular y la expresión del promotor. En este análisis de PCR veíamos también que, tanto en los linfocitos B de los doble transgénicos como en los diferentes órganos de los animales control, donde no debería haber recombinación, volvía a aparecer una débil banda a la altura del producto recombinado.

5.5.2.2. Estudio de la recombinación por Southern Blot

Para comprobar que se trataba de una banda inespecífica y no de eventos de recombinación no controlados en nuestro sistema, realizamos un análisis por Southern Blot de las muestras (Fig. 35b) empleando la sonda y enzimas anteriormente descritas (Fig. 28a). Los resultados demostraron que solamente se producía recombinación (banda R a 3,8 Kb) en los doble transgénicos y específicamente en el linaje T; esto nos estaba indicando que la banda que nosotros obteníamos por PCR era producto de la inespecificidad de la reacción, por lo que en estudios posteriores habría que optimizarla. En el timo las proporciones de las dos bandas se mantenían de forma similar a las obtenidas por PCR; se podía apreciar también una débil marca a la altura del sustrato no recombinado (NR, 1,7 Kb) en los linfocitos T mantenidos en cultivo y activados, lo que nos indicó que, aunque prácticamente inapreciable en nuestras condiciones de PCR, aún quedaba una mínima fracción sin recombinar.

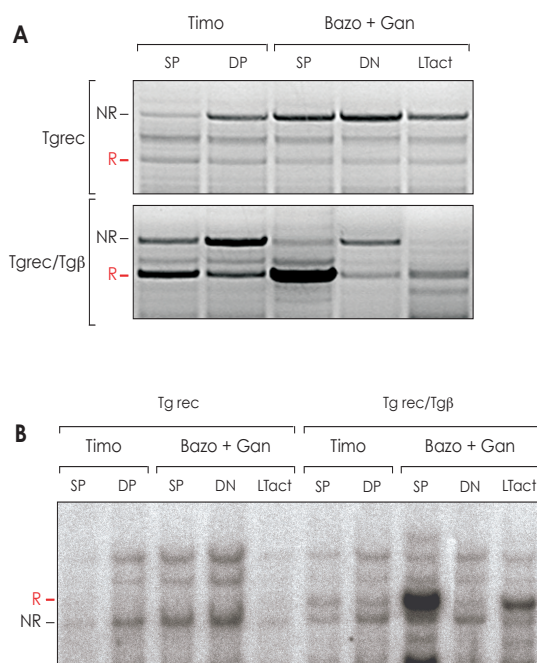


Figura 35. Análisis de la RES en poblaciones linfocitarias altamente purificadas de la línea murina doble transgénica Tgrec/Tgβ.

La población DN corresponde a linfocitos CD4⁺/CD8⁻, la DP a CD4⁺/CD8⁺ y la SP a CD4⁺/CD8⁻ + CD4⁺/CD8⁺. Para obtener un número celular suficiente para el análisis, bazo y ganglios de cada animal se analizaron juntos en una única muestra; LTact corresponde a los linfocitos T SP de bazo y ganglios mantenidos en cultivo durante 5 días en condiciones de activación celular (ver Mats. y Metds.). **A)** Análisis por PCR empleando los oligonucleótidos LCKp y LacZ-2, señalándose la altura respectiva de la banda de recombinación (R, 1'6 Kb) y no recombinación (NR, 2'7 Kb). **B)** Análisis por Southern Blot. Como sonda se ha utilizado el fragmento de 352 pb obtenido de la digestión HindIII/SauI del pLck-rec y el ADN genómico se ha digerido NcoI/EcoRV, lo que permite ver las bandas de recombinación (R, 3'8 Kb) y no recombinación (NR, 1'7 Kb).

5.5.2.3. Estudio de la recombinación por expresión del gen marcador

Por último quisimos también determinar el proceso de recombinación mediante el análisis de la expresión del gen marcador condicional que incluía la línea sustrato, el gen LacZ. Para ello analizamos los linfocitos T de los ratones doble transgénicos y de los transgénicos solo al sustrato (hermanos de camada de los anteriores). Realizamos tanto una tinción de β-galactosidasa como un ensayo de detección de la β-galactosidasa y la β-rec por inmunofluorescencia.

En el caso de la tinción de β-galactosidasa, nos volvió a ocurrir lo mismo que en el caso de la línea celular Jurkat, no fuimos capaces de ver una tinción celular clara e inequívoca.

El ensayo por inmunofluorescencia demostró (Fig. 36a, b y c) que en las dos líneas fundadoras éramos capaces de detectar la β-rec; respecto a la expresión del gen marcador, era únicamente en los ratones doble transgénicos donde se apreciaba la tinción citoplasmática de la β-galactosidasa, que indicaba su expresión y con ello la verificación del correcto funcionamiento del modelo en el entorno murino. En paralelo se analizó la línea Tgβ como control de ambas tinciones: control positivo de expresión de β-rec y control negativo de expresión de β-galactosidasa.

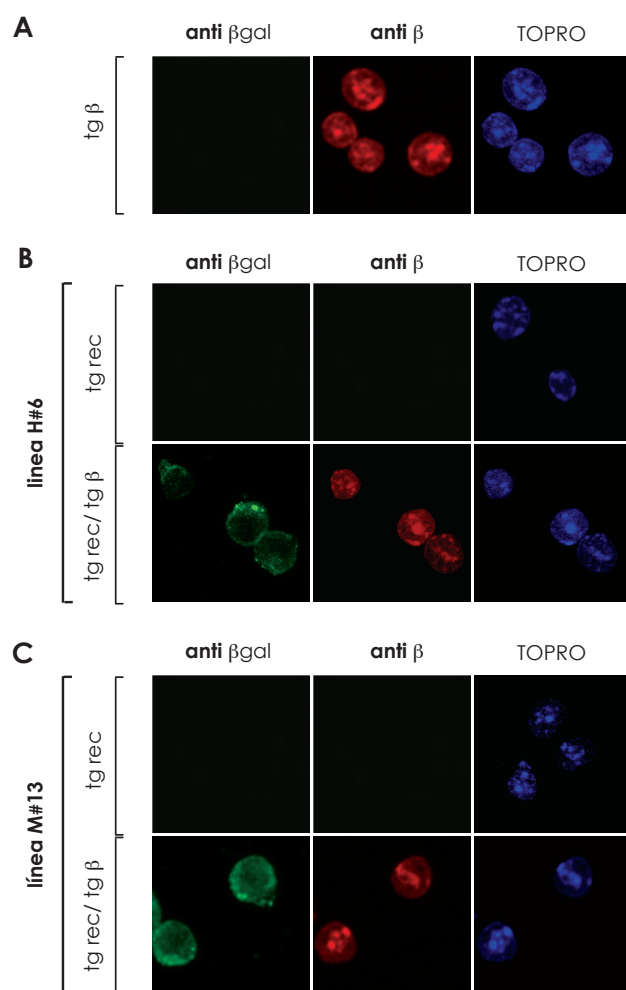


Figura 36. Demostración de la actividad β -rec mediante el análisis del marcador de RAGE (β -galactosidasa) por inmunofluorescencia. Se han utilizado los anticuerpos anti- β y anti- β -gal en la tinción de los linfocitos T. También se ha realizado una tinción con TO-PRO para la visualización del ADN. **A)** Estudio de la línea Tg β . **B)** Estudio de la línea Tgrec H#6. Se observa expresión de β -rec (nuclear) y β -galactosidasa (citoplasmática) únicamente en los ratones dobles transgénicos (Tgrec/Tg β). **C)** Estudio de la línea Tgrec M#13. Se observa expresión de β -rec (nuclear) y β -galactosidasa (citoplasmática) únicamente en los ratones dobles transgénicos (Tgrec/Tg β).

6. MODELO DE KNOCKOUT CONDICIONAL

El protocolo que se empleó en la generación de la línea murina respondedora KO (KOsix) es, en esencia, el descrito previamente (Torres, 1998). Por otra parte, la estrategia global es la misma que la referida en el otro modelo murino generado en este trabajo (Tgrec): generaríamos los ratones sustrato (KOsix), que cruzaríamos con los transgénicos a la β -rec (Tg β), analizando el proceso de recombinación específica de secuencia en la descendencia doble transgénica. En este modelo, sin embargo, buscábamos que los ratones sustrato no hubiesen integrado el casete de forma indeterminada, sino que tuviesen una única copia y ésta estuviese integrada en un locus específico, generando un modelo de ratón transgénico al sustrato de recombinación y paralelamente deficiente a una función génica dada.

El desarrollo de este modelo conllevaba por tanto una mayor complejidad, puesto que no sólo estaríamos a merced de que la expresión de la β -rec en los animales doble transgénicos estuviese restringida a los linfocitos T y fuese funcional, sino que también necesitábamos integrar el casete de recombinación en una región del genoma accesible a la β -rec.

Por ello nuestra estrategia de *targeting* se basó en un modelo preexistente de

Knockout condicional donde ya se había demostrado la accesibilidad del sustrato a la β -rec, en ese caso la recombinasa Cre.

Modelo de KO para la recombinasa Cre

En este modelo (Bouvier et al., 1996) la recombinasa se administraba a las células ES, de modo que era tras la recombinación específica y selección de los clones recombinados cuando se utilizaban éstos en la generación del modelo animal. Esto suponía una diferencia con nuestro sistema, puesto que lo que nosotros planteábamos era un modelo donde la recombinasa no sería administrada de forma exógena, sino que se expresaría tras el cruce de las líneas murinas parentales. Sin embargo, y dado que Cre era capaz de acceder al sustrato y recombinarlo en un tipo celular tan restrictivo en cuanto a expresión proteica y por tanto a condensación del DNA, decidimos proseguir con este abordaje para la generación de nuestro modelo.

6.1. Construcción del vector de *targeting*: clonaje y verificación (RIV)

Nuestra construcción (Fig. 37a) iba a sustituir al *enhancer* de la cadena β del receptor de los linfocitos T (T-Cell β Receptor Enhancer, TCR β e). Éste se encuentra situado entre la región C β 2 y la V β 14 del locus genómico de la cadena β del TCR. El vector pGEM-E-560-R-LNL, cedido por el Dr. P. Ferrier (INSERM-CNRS, Marseille, France), contenía las secuencias correspondientes a los brazos de homología (denominados TCR β 1 y TCR β 2) empleadas en su laboratorio para el modelo de Cre y que nosotros también utilizaríamos. El clonaje que se resume aquí puede parecer algo confuso, pero fue necesaria su realización en la forma y orden en que se relata puesto que así lo requerían los sitios de restricción necesarios presentes en los múltiples componentes.

Una vez verificado que por secuenciación parcial del vector anteriormente citado se obtenía la misma secuencia que en las bases de datos del *Gene Bank*, amplificamos por PCR los dos brazos de homología del gen del TCR β , empleando para ello el kit Expand Long Template PCR (Boehringer Mannheim), en las condiciones indicadas para el tampón 3. Para el brazo corto (3') (TCR β 2), de 1,1 Kb, se emplearon los oligonucleótidos TCRb2s, que lleva una diana *Ascl*, y TCRb2as, con un sitio *Pacl*. Para el brazo largo (5') (TCR β 1), de 2,8 Kb, se emplearon los oligonucleótidos LTCRBS, que introduce una diana *FseI*, y TCRb1as, con un sitio *PmeI*. Ambos fragmentos fueron clonados en el plásmido pTA-cloning vector PCR 2.1, verificándose la secuencia por restricción y secuenciación.

Por otro lado generamos los plásmidos que serían nuestros esqueletos (pUC-NP y pUC-NF) por inserción de los *polylinker* NP y NF (generados con los oligonucleótidos PUC-NPs/as y PUC-NFs/as respectivamente) en el pUC-m. El gen de la timidina kinasa (TK), que utilizaríamos en la selección de los clones de ES positivos a la integración homóloga, se obtuvo del plásmido pPNT por digestión con *EcoRI* y *HindIII*, clonándose en el pUC-NF y dando el pUC-TK. El objeto de este subclonaje fue la introducción de las dianas de restricción necesarias para insertar este gen en el vector definitivo.

Se clonó el primero de los sitios *six* en el pUC-NP *XbaI*/*HindIII* y posteriormente el segundo *BamHI*/*SpeI* dando el pUC-six2, proviniendo ambos del pRECOMBINER y quedando en orientación directa, lo cual fue comprobado por restricción. Posteriormente se introdujo entre ambos sitios *six* *XhoI*/*EcoRI* el gen de resistencia a la neomicina procedente del pGKneobpA, dando el pUC-sns. En ese vector se clonó el gen de la TK del pUC-NF con las enzimas *NotI* y *FseI*, resultando el pUC-TK-sns, en el cual introdujimos, de forma escalada, los dos brazos de homología (en primer lugar el TCR β 2 *Ascl*/*Pacl* y posteriormente el TCR β 1 *FseI*/*PmeI*) que nos darían el psix-neo-sixTCR β (psixTCR β), vector definitivo que se utilizó en nuestra estrategia de *gene targeting*.

En la figura 37a se muestra la estructura del vector definitivo y el proceso de recombinación homóloga que éste debía sufrir para integrarse correctamente en el genoma de las células ES (ver Introducción).

Se realizó una secuenciación completa de los sitios six y del resto de la construcción; una vez comprobado que poseía la secuencia correcta realizamos un ensayo de recombinación *in vitro* para verificar su capacidad de recombinación. Como muestra la figura 37b, nuestro vector era capaz de ser recombinado, apreciándose en la digestión con EcoRV la banda correspondiente a la fracción recombinada (1 Kb) únicamente en la preparación que había sido tratada con la β -rec y el cofactor de la reacción.

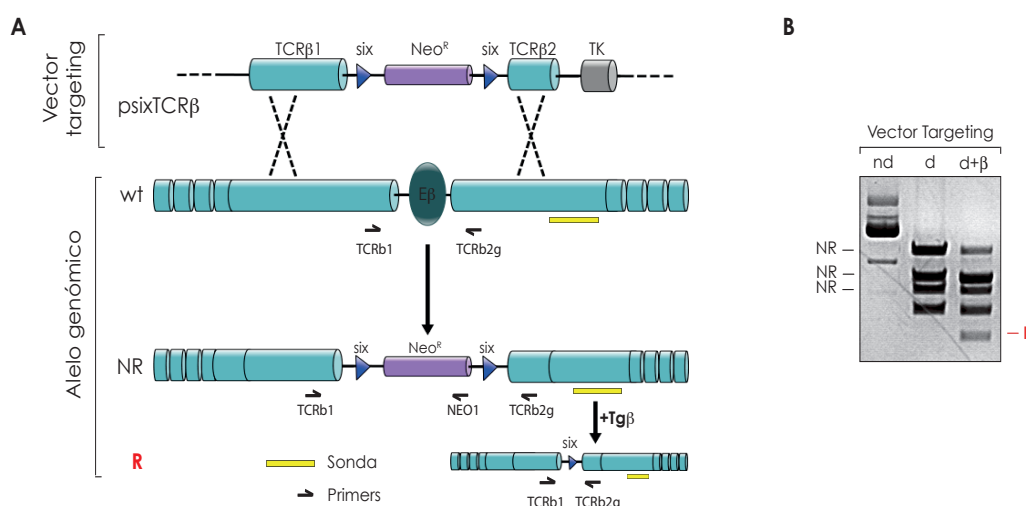


Figura 37. Estructura del vector de targeting (psixTCR β) y demostración de su capacidad de RES mediante el estudio de la RIV. A) Se muestran el vector de targeting (psixTCR β), el alelo wt con el locus genómico donde se realizará la recombinación homóloga, el alelo (NR) ya recombinado de forma homóloga (es decir, ya modificado) pero sin recombinar de manera específica de secuencia, RES, y el alelo modificado tras la recombinación específica de secuencia (R). Están indicados los oligonucleótidos utilizados en el genotipado de los ratones por PCR (TCRb1, TCRb2g y NEO1). Está indicada la posición de la sonda utilizada en el genotipado de los animales y el estudio de la recombinación mediante la técnica de Southern Blot. **B)** Ensayo de RIV del vector psixTCR β que demuestra su capacidad de RES; nd indica la muestra de plásmido sin digerir; d indica la muestra sin β -rec y digerida con EcoRV; d+ β indica la muestra de reacción a la que se ha añadido β -rec y ha sido digerida con EcoRV.

6.2. Obtención y análisis de clones de ES portadores del sustrato

Una vez comprobada la funcionalidad de nuestro vector, éste se linearizó con la enzima PaeI y se introdujo en células ES (R1, 129sv) mediante electroporación. Tras la recombinación homóloga, el TCR β ϵ habría sido sustituido por nuestro casete; éste llevaba el gen de resistencia a la neomicina, lo que nos permitió seleccionar los clones que hubiesen realizado la integración de forma estable y completa (selección positiva); por otra parte nuestro vector llevaba externamente al brazo TCR β 1 el gen de la TK; la expresión de este gen en presencia de la droga ganciclovir implica la muerte celular (selección negativa), lo que nos permitió eliminar gran parte de las recombinaciones no homologas y por tanto inespecíficas.

Tras la selección se analizaron 576 clones y obtuvimos 7 positivos a la recombinación homóloga (1,22%). En la figura 37a se muestra la estrategia de análisis mediante *Southern Blot* empleada en la detección y discriminación del alelo wt (3 Kb) frente al recombinado de forma homóloga (NR, 4,2 Kb); en el análisis se emplea como enzima de corte EcoRV y

como sonda el fragmento de 586 pb resultante de la digestión EcoRV/SpeI del vector de *targeting* (dicho fragmento se encuentra situado en el brazo corto de homología). En la figura 38a se muestra un resultado representativo del análisis de uno de los clones positivos y de un clon wt.

Previo a la agregación realizamos el estudio del cariotipo de los clones positivos, donde la tinción con DAPI de metafases celulares mostraría las aberraciones cromosómicas que se hubiesen producido. Vemos representada en la figura 38b una metafase correspondiente a uno de los clones (1F4). En los 7 clones positivos las metafases eran correctas, donde más de un 80% presentaba 40 cromosomas sin anomalías aparentes; sin embargo, existía la posibilidad de algún problema ulterior en el proceso de recombinación específica de secuencia, por lo que realizamos agregaciones de todos ellos.

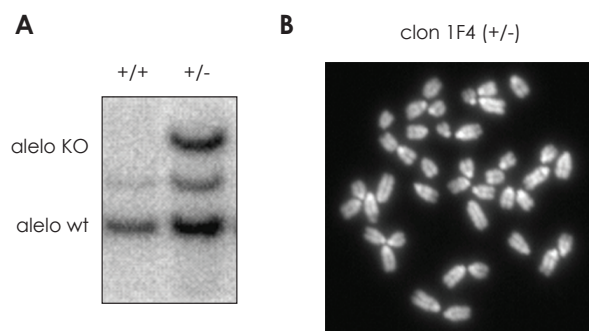


Figura 38. Genotipado y análisis del cariotipo de los clones de ES modificados. **A)** *Southern Blot* representativo de un ratón wt (+/+) y otro heterocigoto (+/-). **B)** Muestra de un cariotipo correspondiente a uno de los clones.

6.3. Estudio de la recombinación específica de secuencia en células ES

Dado que en el modelo original para Cre la recombinación específica de secuencia había sido inducida en el estadio de células ES, decidimos analizar nuestro sistema en dicho entorno.

6.3.1. Comparativa de la eficacia de transfección en ES de diferentes promotores y esqueletos

Comenzamos el análisis haciendo una comparativa de la eficiencia en la transfección de los diferentes vectores y promotores de expresión de β -rec que disponíamos. Para ello se realizó la electroporación (o transducción en el caso de los vectores retrovirales) de un número variable de células, analizándose la tasa de transfección obtenida en cada caso mediante el estudio citométrico de la Egfp (gen marcador que incluían todas las construcciones empleadas). Como se muestra en la tabla 2, las medidas fueron tomadas 24h y 48h tras la electroporación. Como control de transfección utilizamos 2×10^6 células NIH-3T3 y en cuanto a las células ES wt, testamos cantidades crecientes ($1 \times 10^6 - 9 \times 10^6$) buscando el número óptimo a transfectar.

Los plásmidos que incluían el gen de resistencia a la higromicina (tanto con el promotor del CMV como los del EF1 α) se habían generado y testado en el transcurso de otros experimentos, mientras que los restantes habían sido utilizados ya ampliamente en nuestro laboratorio. Los plásmidos control, deficientes en β -rec, presentaron en todo momento una mayor tasa de transfección que sus homólogos con β -rec. De estos últimos, el p β Egfp fue el que mostró mayor eficacia tanto en NIH-3T3 como en ES (3,9%). Tras optimizar el protocolo (cambio de medio de cultivo y siembra celular a media confluencia 12h y 36h antes de la transfección respectivamente; disgregación celular completa previa a la transfección; lavado y centrifugación tras la transfección en un mínimo de 10 volúmenes de electroporación), se alcanzó un 15,3% de expresión para este vector, lo que nos permitió la continuación del estudio en mejores condiciones.

		Tipo y número de células electroporadas					
		NIH-3T3		ES			
		EXPRESION DE GFP (%)	2.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	9.10 ⁶
Vector y promotor utilizado	pCMV	p-EgfçpN1	36,6	16,5 / 13,9	13,4 / 10,8	19,9 / 18,5	64,1 / 49,8
		p-βEGFPN1	15,5	0,4 / 0	1,6 / 0,5	2,4 / 0,4	3,9-15,3 / 1
		pCDNA-EgfpHYGRO	12,9	ND	ND	ND	34,1 / 23,1
		pCDNA-βEgfpHYGRO	10,1	1,9 / 0,6	1,9 / 0,2	1,5 / 0,4	2,1 / 0,4
	pEF1α	pLZR-βEgfp	8,4	0,4 / 0	0 / 0,4	0,2 / 0	0 / 0
		pEF-EgfpHYGRO	5,4	ND	ND	ND	9,7 / 2,7
		pEF-βEgfpHYGRO	1,5	ND	ND	ND	0,2 / 0,1

medida a las 24h / 48h post electroporación

medida a las 24h / 48h post electroporación

Tabla 2. Comparativa de la eficacia de transfección en células NIH-3T3 y ES de diversos vectores portadores de la β-rec. Los vectores llevan el gen de la Egfp (han sido utilizados como control) o el gen de la Egfp fusionada a la β-rec (β-Egfp) bajo el control de diversos promotores; se han probado los promotores episomales CMV y EF1α y el promotor interno del vector retroviral (LZR). Las muestras se tomaron a las 24h y 48h de la transfección.

6.3.2. Transfección de la β recombinasa en clones positivos al sustrato y análisis de la recombinación

Con el protocolo de electroporación ya optimizado en células ES wt, transfectamos el pβEgfp en dos de los 7 clones de ES positivos (1F4 y 5D4) y analizamos por PCR la presencia de la banda de recombinación, empleando para ello la mezcla en una misma reacción de tres oligonucleótidos: TCRb1, NEO1 y TCRb2g. En la figura 37a se muestra el esquema del análisis utilizado. Los clones 1F4 y 5D4 eran heterocigotos a la construcción por lo que tras su transducción con la β-rec esperábamos obtener tres bandas: la del alelo wt a 600 pb, que probablemente no habría desaparecido completamente, la del alelo recombinado de forma homóloga (NR) a 1,22 Kb, y la del alelo recombinado de forma homóloga tras sufrir la recombinación específica de secuencia (R) a 300 pb.

En los primeros ensayos no logramos detectar de forma clara la banda de recombinación específica de secuencia: se electroporaron 9×10^6 células de cada uno de los dos clones y se plaquearon a una dilución muy baja. Esto nos permitió seleccionar 48 subclones de cada clon y crecerlos individualmente. Cada uno de ellos se analizó por PCR, pero no fuimos capaces de detectar el producto recombinado de una forma inequívoca (datos no mostrados).

Gracias a las técnicas de que disponíamos y a las características del sistema, nuestro siguiente paso fue purificar por FACS la población Egfp⁺, analizando en ella la recombinación específica de secuencia. En la figura 39a se muestra la expresión de Egfp tras la transfección (se alcanzó un valor de transducción del 13,1%) y purificación posterior (98,5%). El análisis de la recombinación se muestra en la figura 39b, donde detectamos claramente el producto recombinado en los dos puntos que incluyen la β-rec; sin embargo la tasa de recombinación no alcanzó niveles sensiblemente superiores al mostrado en los sucesivos ensayos realizados.

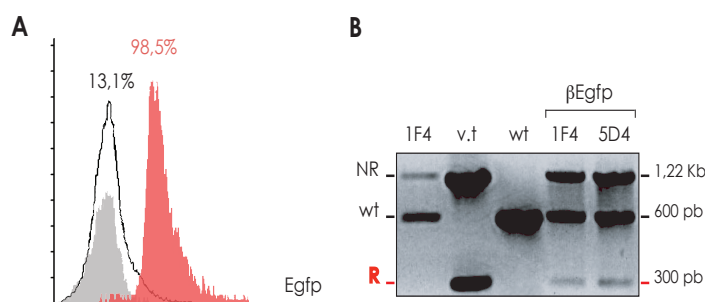


Figura 39. Análisis de la RES en los clones de ES modificados (NR) y electroporados con el plásmido pβEgfp. A) Estudio citométrico representativo donde vemos la expresión de Egfp en células ES portadoras del sustrato, antes y después de su purificación por FACS.

B) Análisis por PCR de la RES. Las muestras de los clones 1F4 y 5D4 electroporados con el plásmido pβEgfp corresponden a las células purificadas por FACS. El clon 1F4 y la muestra de células wt se utilizaron como controles negativos, y el vector de *targeting*, v.t (psixTCRβ) se empleó tras su RIV como control positivo. Se han anotado las posiciones y tamaños respectivos de las tres bandas esperadas: wt (600 pb), NR (1'22 Kb) y R (300 pb).

6.4. Agregación y obtención de líneas murinas respondedoras

Mediante la agregación de los 7 clones de ES positivos para la recombinación homologa se obtuvieron 16 quimeras. Seis de ellas, pertenecientes a 5 clones de ES distintos, mostraron transmisión a la línea germinal, lo cual se detectó por el pelaje negro propio de las células ES 129Sv (en contra del color blanco propio de la cepa murina CD1 que presentaban los hermanos de camada wt). Es de destacar la alta transmisión que se obtuvo (en tres de los casos de un 100%) dado que el grado de quimerismo que presentaron en general nuestros ratones fue muy bajo en intensidad de color, apenas distinguiéndose en algunos casos de sus hermanos de camada wt.

Dado que algún clon de partida podía presentar mutaciones mínimas no detectadas en los sitios de reconocimiento a la β-rec que imposibilitasen la recombinación específica de secuencia, establecimos las líneas murinas respondedoras a partir las seis quimeras obtenidas con capacidad de transmisión a la línea germinal. Los animales obtenidos en cada una de ellas, heterocigotos para nuestra construcción, se cruzaron entre sí hasta la obtención de ratones Knockout (homocigotos), lo cual se confirmó mediante *Southern Blot* o PCR de ADN de cola. En la figura 40 se muestran los diferentes estadios del proceso representados por algunos de los animales obtenidos y el análisis por *Southern Blot* de un ratón representativo de cada genotipo.

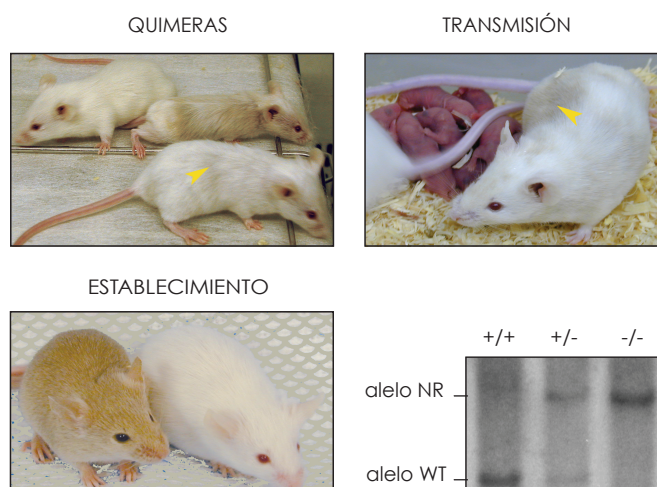


Figura 40. Secuencia de fotografías de la generación de la línea murina KOsix. En la primera imagen se encuentran las quimeras obtenidas. Se indica la mancha de color correspondiente al quimerismo. En la siguiente imagen se muestra un ratón quimera junto a su descendencia. En la descendencia encontraremos animales wt (+/+) y animales heterocigotos (ht, +/-), que cruzaremos para obtener los homocigotos (-/-). La última

imagen nos muestra el genotipado de un ratón de cada clase; vemos el alelo wt a 3 Kb y el alelo NR (es el alelo modificado por recombinación homóloga) a 4'2 Kb.

6.5. Análisis fenotípico

Siguiendo proporciones mendelianas se alcanzó la homocigosis en las 6 líneas establecidas, donde ninguna presentó anomalías en cuanto a peso o fertilidad, con camadas de un tamaño normal. La única diferencia observada entre los animales homocigotos y sus homólogos wt o heterocigotos fue una mortalidad más temprana en los primeros. Este hecho tendría su explicación en la ausencia de linfocitos T-TCR $\alpha\beta$ que teóricamente debían presentar los ratones homocigotos (Mathieu et al., 2000), lo que los haría más susceptibles a la adquisición, desarrollo y no recuperación de los posibles procesos patológicos que pudieran sufrir.

6.5.1. Datos generales de la maduración de los linfocitos T

La maduración de los linfocitos T (Yui and Rothenberg, 2014) se produce en el timo y mayoritariamente en su zona cortical. De él migrarán a la circulación periférica las dos poblaciones principales de timocitos, que se distinguen por el tipo de receptor que expresan, el TCR (Ceredig and Rolink, 2002): la fracción mayoritaria expresa en su superficie la molécula TCR $\alpha\beta$, que junto con el co-receptor CD3, acompaña la expresión de CD4 o/y CD8; la fracción minoritaria expresa las moléculas TCR $\gamma\delta$ y CD3 y es doble negativa (DN) a los marcadores CD4 y CD8 (ver figura 49).

El procesamiento y expresión del TCR $\gamma\delta$ se produce en la etapa de timocitos DN dando los timocitos TCR $\gamma\delta$ maduros; en paralelo transcurre en los timocitos DN (CD4⁻/CD8⁻) la formación de un pre-TCR $\alpha\beta$ no funcional. Éste sufrirá un reordenamiento posterior para dar lugar a timocitos con un TCR $\alpha\beta$ activo el cual, asociado al CD3 y a las moléculas CD4 y CD8, conformará los timocitos DP (CD4⁺/CD8⁺). Estos migrarán a la médula tímica, donde tendrá lugar una ulterior selección dando los timocitos maduros SP (CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺), que alcanzarán la circulación sanguínea en dirección a los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos). La ausencia del *enhancer* del TCR β impide la reordenación del TCR β en más de un 95% (Bories et al., 1996), lo que paraliza la maduración de linfocitos T TCR $\alpha\beta$.

6.5.2. Análisis histológico del timo

En los estudios realizados encontramos que, mientras el bazo de los animales homocigotos mantenía una celularidad similar a los heterocigotos y wt, el timo y los ganglios linfáticos se veían drásticamente afectados, llegando a verse una reducción en su celularidad de hasta un 30%, por lo que quisimos verificar las diferencias histológicas que sin duda presentaría el timo de estos animales.

Para ello se realizaron inclusiones en parafina del timo de animales de los tres genotipos y se analizaron los cortes con una tinción hematoxilina-eosina. Como se aprecia claramente en la figura 41, los cortes histológicos de los ratones wt y heterocigotos eran indistinguibles, mientras que en el caso del homocigoto se observaba una gran alteración: la médula tenía muy disminuida su celularidad y la zona cortical estaba muy reducida tanto en grosor como celularidad.

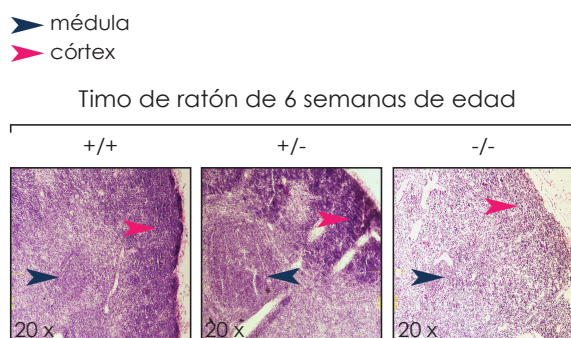


Figura 41. Estudio histológico comparativo del timo de animales wt y KOsix (heterocigotos y homocigotos). Este estudio preliminar nos muestra cómo se ve afectado el timo en los ratones modificados. Animales de seis semanas de edad de los tres genotipos fueron sacrificados y se analizó la celularidad y estructura del timo mediante la tinción hematoxilina-eosina. Las flechas rosas señalan el córtex mientras que las negras indican la zona medular.

6.5.3. Estudio citométrico de las poblaciones linfocitarias

Quisimos además determinar mediante un estudio citométrico la distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias que presentaban nuestros ratones respondedores KOsix, para ver si se correspondían con lo observado en el caso del modelo que empleaba la recombinasa Cre (Bouvier et al., 1996).

En ejemplos representativos de cada grupo (Fig. 42), se muestra el análisis de los órganos de mayor presencia linfocitaria, como son el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. Las distintas poblaciones de los animales heterocigotos no mostraron ninguna variación respecto a sus homólogas wt, lo que indicaba que la presencia del alelo wt lograba compensar las posibles deficiencias ocasionadas por el otro alelo. En el caso de los animales homocigotos no había compensación posible y pudimos verificar el fenotipo teórico que se les atribuía (Bories et al., 1996; Bouvier et al., 1996). Presentaban un descenso importante en el número de linfocitos T en estadio de DP, una ausencia prácticamente total de linfocitos T-TCR $\alpha\beta$ SP y un desequilibrio entre células B y células T totales. Examinamos además las dos variantes posibles del gen del TCR: mientras que en condiciones normales los linfocitos T-TCR $\alpha\beta$ constituían prácticamente la totalidad de la población y apenas detectábamos los TCR $\gamma\delta$, en los ratones homocigotos los linfocitos T-TCR $\alpha\beta$ habían desaparecido, siendo compensada su ausencia parcialmente por los linfocitos T-TCR $\gamma\delta$.

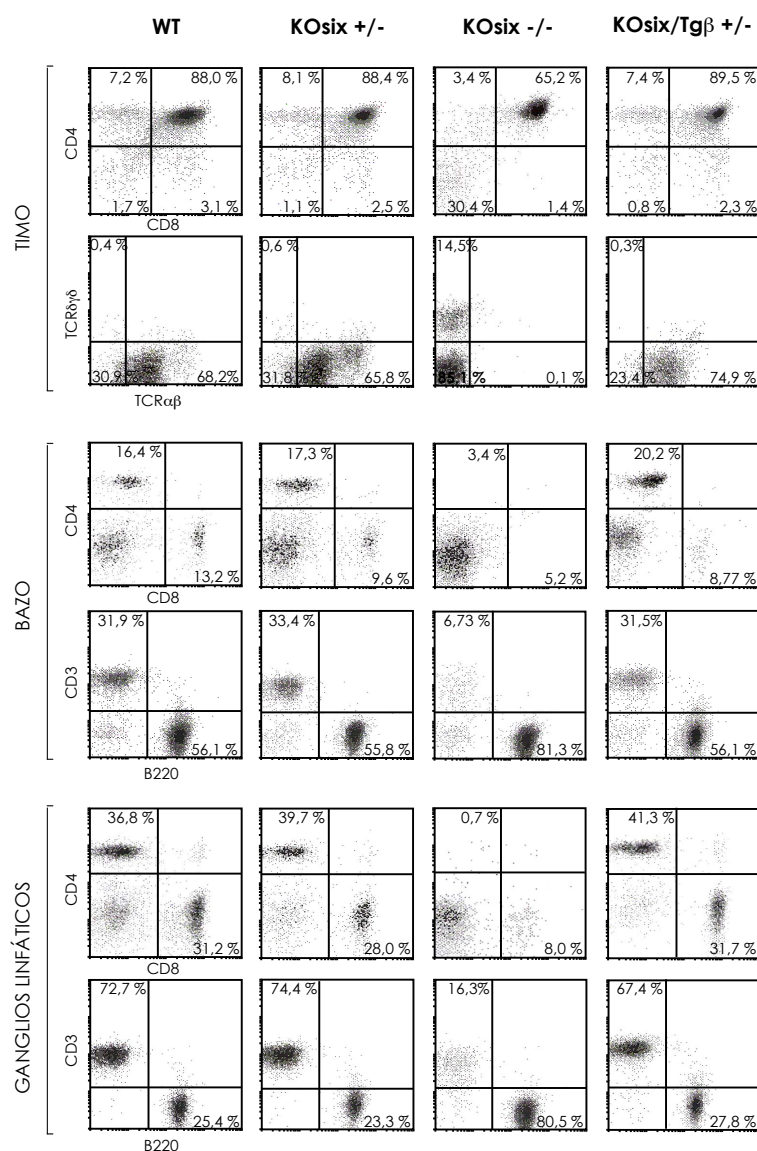
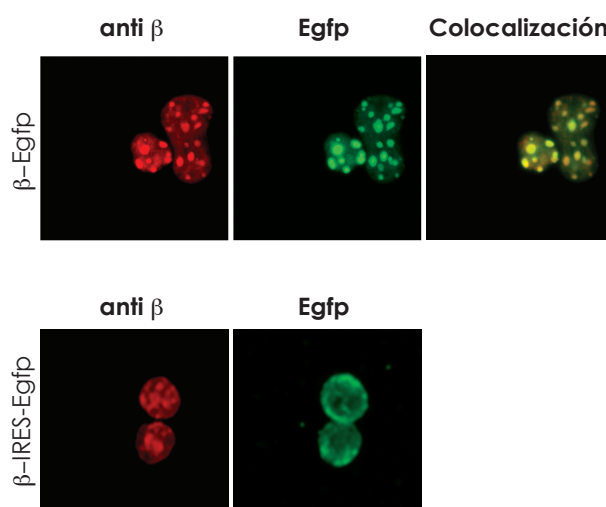


Figura 42. Análisis citométrico de las poblaciones linfocitarias de animales wt, KOsix (heterocigotos y homocigotos) y dobles KOsix/Tgβ. Los animales heterocigotos (tanto los KOsix/+ como los KOsix/Tgβ+/-) no muestran ninguna alteración significativa respecto a los animales wt en ninguna de las poblaciones linfocitarias analizadas. Los animales homocigotos (KOsix/-), sin embargo, tienen alteradas todas las poblaciones estudiadas; la interrupción en la maduración de los linfocitos T TCR $\alpha\beta$ hace que prácticamente desaparezcan los linfocitos T SP (CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺), lo que altera el porcentaje de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ del timo y de los linfocitos B del bazo y los ganglios linfáticos.

6.6. Infección con la β recombinasa de linfocitos T primarios: Análisis de la expresión proteica y estudio de la recombinación

Al igual que en los ratones transgénicos al sustrato de recombinación (Tgrec), analizamos el proceso de recombinación específica de secuencia en células primarias obtenidas de los ratones KOsix. Para ello purificamos los linfocitos T del bazo de animales homocigotos y los transdujimos con el sobrenadante viral producido por los vectores pLZR β -IRES-Egfp y pLZR β -Egfp. En un primer análisis determinamos el mantenimiento de la localización funcional de la β -rec por inmunofluorescencia. La figura 43 muestra claramente que ésta era correcta tanto en su forma individual como en la fusión. La Egfp por su parte localizaba per se preferentemente en el citoplasma celular, mientras que en la fusión colocalizaba con la β -rec en el núcleo de la célula.

Figura 43. Localización de la β -rec en linfocitos T primarios KOsix/- transducidos con los vectores retrovirales pLZR- β -Egfp y pLZR- β -IRES-Egfp. Este estudio se realizó de forma previa a la determinación de la RES en esta población celular. **A)** Localización de la proteína de fusión β -Egfp tras la infección con el pLZR- β -Egfp. **B)** Localización de la β -rec y de la Egfp, ambas proteínas individuales, tras la infección con el pLZR- β -IRES-Egfp.



En los ensayos de recombinación utilizamos únicamente la proteína de fusión β -Egfp dado que ya había demostrado tener actividad en el mismo tipo celular. Se transdujeron de nuevo con el pLZR β -Egfp linfocitos T esplénicos de animales homocigotos y se analizó la recombinación por PCR tras purificar la población Egfp⁺. En las figuras 44a, 44b y 44c se muestran los datos de una de las transducciones realizadas, el resultado de su análisis por PCR y el esquema que utilizamos (PCR) para la detección de la recombinación en linfocitos T, empleando los oligonucleótidos TCRb1 y ScrESas y la ADN polimerasa *Long Expand*. La tasa de transducción alcanzó prácticamente el 60% y aunque el porcentaje de recombinación no fue muy alto, resultaba perfectamente visible (NR a 3,2 Kb y R a 1,5 Kb) y confirmaba la potencialidad de la reacción a nivel de células primarias.

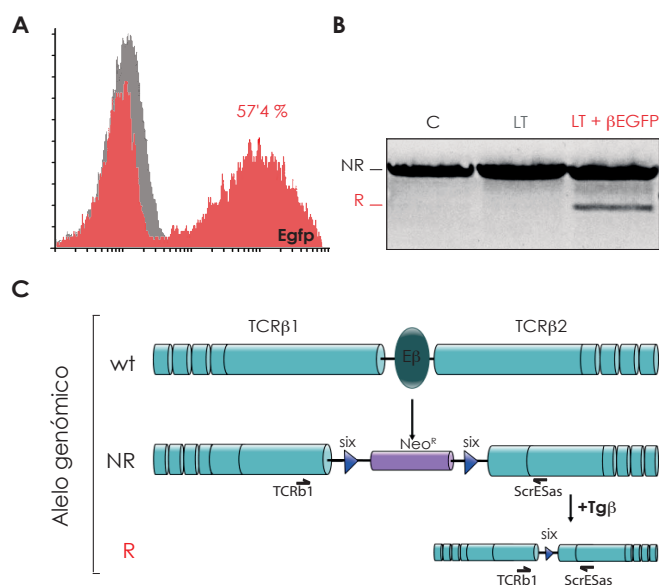


Figura 44. Análisis funcional de la actividad β recombinasa en linfocitos T primarios de animales KOsix^{-/-}.

A) Transducción de linfocitos T esplénicos de ratones KOsix^{-/-} (homocigotos) con el vector retroviral pLZR- β -Egfp. Se alcanzó un 60% de transducción. **B)** Análisis de la recombinación por PCR en los linfocitos T transducidos y purificados por FACS (LT+ β Egfp). Como control se utilizaron las mismas sin infectar (LT); el ADN procedente de la cola del mismo animal se utilizó como control adicional (C). **C)** Esquema del análisis por PCR de la RES; los oligonucleótidos TCRb1 y ScrESas permiten diferenciar la fracción recombinada (R) a 1'5 Kb, y la no recombinada (NR) a 3'2 Kb.

6.7. Análisis de la recombinación en ratones *Knockout* al sustrato y transgénicos a la β recombinasa

Como se ha explicado anteriormente, nuestro objetivo final era el análisis del potencial de nuestro sistema de recombinación específica de secuencia en los modelos murinos y no únicamente en líneas celulares primarias. Para ello realizamos cruces entre los animales sustrato (KOsix) y los animales transgénicos a la β -rec (Tg β). En estos ratones, como muestra el esquema representativo de la figura 45, lo que se esperaba era que, al igual que en el modelo de transgénesis anterior, el proceso de recombinación tuviese lugar exclusivamente en los tejidos de actividad del promotor Lck. Al tratarse de un modelo de KO, los homocigotos tendrían dos copias del casete, mientras que los animales doble transgénicos únicamente habrían heredado una de ellas (heterocigosis).

El análisis de la recombinación se llevó a cabo por PCR, empleando los oligonucleótidos TCRb1, NEO1 y TCRb2g y las condiciones anteriormente mencionadas. En la figura 37a se muestra el esquema así como los tamaños respectivos de las bandas de interés (wt a 600 pb, NR a 1,2 Kb y R a 300 pb). El estudio se realizó, al igual que en el modelo de doble transgénesis, obteniéndose un incremento progresivo en la pureza de las diferentes poblaciones linfocitarias analizadas.

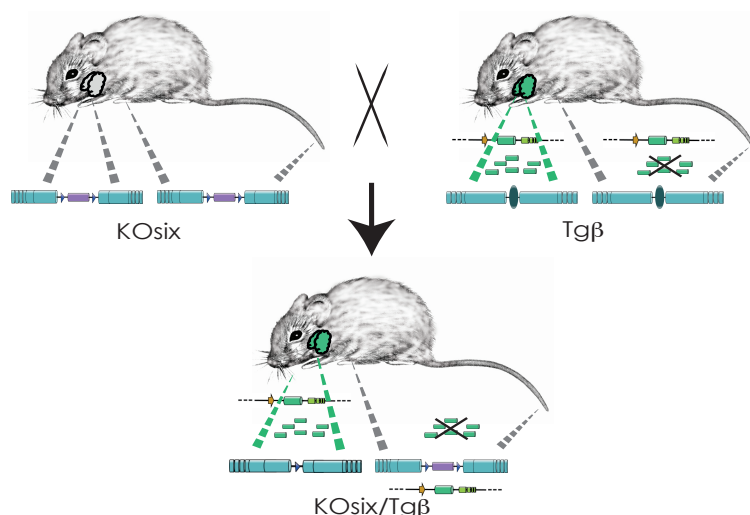


Figura 45. Representación del fenotipo de las líneas murinas progenitoras (KO condicional, KOsix, y transgénica a la β -rec, Tg β) y de la línea murina doble transgénica (KOsix/Tg β).

Se indica tanto el estado de recombinación del sustrato (NR o R) como la expresión de la β -rec, la cual se ha representado restringida al timo de forma simbólica, porque también se expresa, aunque en menor medida, en bazo y ganglios.

6.7.1. Análisis de la recombinación en timo, órganos linfoides secundarios y poblaciones linfocitarias parcialmente purificadas

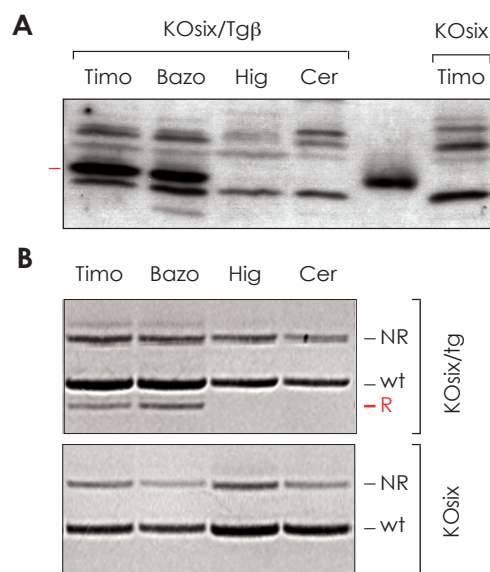
6.7.1.1. Estudio en órganos totales

En un primer análisis se extrajeron las células totales de los órganos en estudio. Estas se utilizaron en la verificación por *Western Blotting* de la expresión selectiva de la β -rec (Fig. 46a) y en su correspondiente análisis de recombinación por PCR (Fig. 46b). En el *Western Blot* aparecía una banda de tamaño ligeramente inferior a la β -rec, la cual ya había aparecido en otras ocasiones, pero que logramos separar suficientemente para descartar de forma definitiva la posibilidad de un escape en la regulación de su expresión.

El análisis por PCR demostró que se había producido la reacción de recombinación específica de secuencia y que ésta cumplía perfectamente la selectividad de tejido impuesta por la expresión de β -rec, pero también señaló la presencia de una importante fracción del sustrato en su forma no recombinada.

Figura 46. Análisis preliminar de la RES en la línea murina doble transgénica KOsix/Tg β . A)

Expresión selectiva de la β -rec (25 KDa) en un animal doble transgénico (KOsix/Tg β). Se analizaron 20 mg de extracto de timo, bazo, hígado (Hig) y cerebro (Cer) de ratones KOsix/Tg β y 20 mg de timo de ratones KOsix. Como control se añadieron 2ng de β -rec pura. **B)** Análisis representativo de la recombinación en órganos completos (sin purificar las diferentes poblaciones linfocitarias que contienen) de la línea doble KOsix/Tg β y la línea sustrato KOsix, que sirve de control. Se han utilizado los oligonucleótidos TCRb1, NEO1 y TCRb2g, que son capaces de detectar la banda wt, la NR y la R en la misma reacción de PCR; se indican las bandas del alelo wt (wt, 600 pb) y las del alelo KOsix, tanto en su estado recombinado (R, 300 pb) como no recombinado (NR, 1'22 Kb).



6.7.1.2. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos B

En la siguiente etapa del estudio se procedió al enriquecimiento de los linfocitos B del bazo. El análisis por PCR (Fig. 47a) mostró la desaparición de la banda de recombinación en la población negativa (la enriquecida en linfocitos B), así como un ligero incremento de la positiva (correspondiente a los linfocitos T).

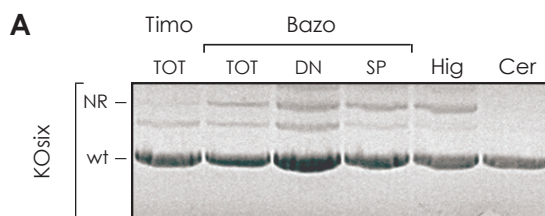


Figura 47. Análisis de la RES en poblaciones linfocitarias parcialmente enriquecidas de la línea murina doble transgénica KOsix/Tg β . Se analizaron tanto el timo y el bazo totales (TOT) como diversas poblaciones celulares. Como controles se utilizaron el hígado (Hig) y el cerebro (Cer). Los oligonucleótidos empleados en el análisis fueron TCR β 1, NEO1 y TCR β 2g; se indican las bandas del alelo wt (wt, 600pb) y las del alelo KOsix, tanto en su estado recombinado (R, 300 pb) como no recombinado (NR, 1'22 Kb). **A)** Enriquecimiento de linfocitos B de bazo de animales dobles transgénicos (KOsix/Tg). En bazo la fracción DN corresponde a los linfocitos B enriquecidos y la fracción SP a todos los demás tipos celulares.

6.7.1.3. Estudio tras el enriquecimiento en linfocitos T totales

Posteriormente realizamos un enriquecimiento de los linfocitos T totales mediante separación magnética (ver Mats. y Metds.). Con este sistema, como ya habíamos visto, lográbamos eliminar la mayor parte de los contaminantes, lo que debería verse reflejado en los resultados del análisis. Como se puede ver en la figura 47b, vimos un incremento mayor en el bazo, donde habíamos logrado prácticamente tener un 100% de recombinación; en el timo, aun habiendo recombinado en gran medida, quedaba aún una fracción minoritaria por recombinar.

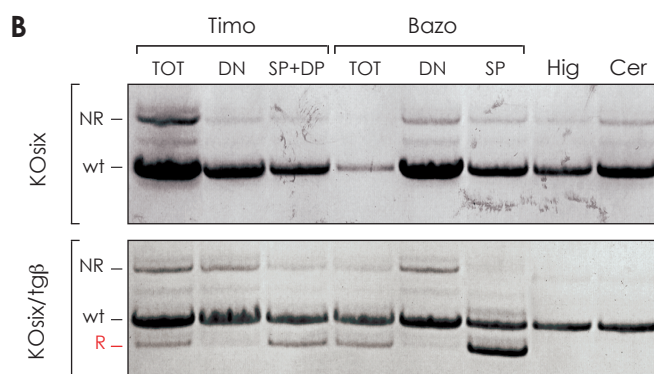


Figura 47. B) Enriquecimiento de linfocitos T de animales dobles KOsix/Tg β . En las fracciones celulares de timo la población DN corresponde a linfocitos CD4/CD8 $^{-}$, la DP a CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ y la SP a CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ +CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$. En esta etapa del análisis no se discrimina entre linfocitos T tímicos DP y SP, ambas fracciones celulares se encuentran en la misma muestra. En bazo la fracción SP corresponde a los linfocitos T SP enriquecidos y la fracción DN corresponde a todos los demás tipos celulares.

6.7.2. Análisis por PCR de la recombinación en poblaciones de linfocitos T altamente purificadas

Por último decidimos, al igual que en el otro modelo murino, purificar por FACS las dos subpoblaciones de linfocitos T (DP y SP). Esta metodología nos permitiría extrapolar los datos de recombinación a la pureza obtenida tras la purificación y obtener un análisis detallado de la recombinación respecto a la maduración linfocítica. Como se puede ver en la figura 48, la población de timocitos DP ($CD4^+/CD8^+$) presentaban una baja tasa de recombinación, mientras que en la población de SP ($CD4^+/CD8^-$ o $CD4^+/CD8^+$) la situación se invertía quedando como fracción mayoritaria la recombinada. Por otra parte, en los órganos linfoides secundarios se podía ver claramente que la población de linfocitos T (SP) había recombinado de forma completa.

Todo ello nos permitió postular que en nuestro modelo la recombinación se estaba produciendo de una forma progresiva y que el factor limitante del proceso era la expresión de β -rec, y con ello su acumulación en la célula en cantidad suficiente para recombinar su sustrato. No podemos descartar que el estado proliferativo de las células diana tenga influencia (moderada) sobre la estructura del locus genómico diana, y pueda influir sobre la eficiencia de recombinación β /six.

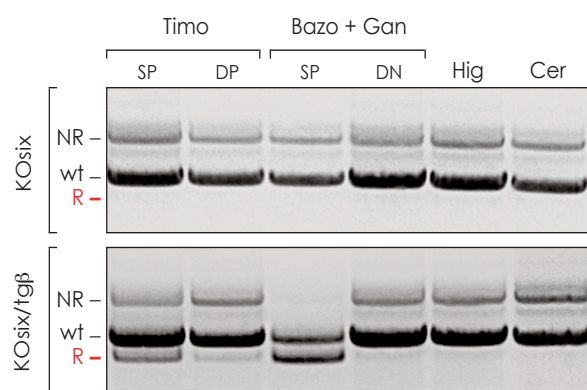


Figura 48. Análisis de la RES en poblaciones linfocitarias altamente purificadas de la línea murina doble transgénica KOsix/Tg β . En timo la población DP corresponde a LT $CD4^+/CD8^+$ y la SP a $CD4^+/CD8^-$ + $CD4^+/CD8^+$. En bazo y ganglios (analizados juntos) la población SP corresponde a los LT $CD4^+/CD8^-$ + $CD4^+/CD8^+$ y la población DN a los LT $CD4^+/CD8^-$. Como controles se utilizaron el hígado (Hig) y el cerebro (Cer) de esos mismos animales.

DISCUSIÓN

PARTE I: MODELOS DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA EN LÍNEAS CELULARES

1. DESARROLLO DE VECTORES RETROVIRALES DE EXPRESIÓN DE LA β RECOMBINASA Y DEL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN

1.1. Vectores de expresión de la β recombinasa

Estudios previos habían demostrado la funcionalidad en el entorno eucariota tanto de la proteína β como de la fusión β -Egfp (Díaz et al., 2001). Sin embargo, debido a la moderada eficiencia de transfección de los vectores, el proceso de obtención de células positivas a la proteína era tedioso, necesitándose una posterior selección celular para obtener un porcentaje positivo aceptable para la realización de los experimentos subsiguientes. La intención en este trabajo era generar nuevos vectores para la expresión de nuestra recombinasa que tuviesen una eficacia de transfección mayor, de modo que se facilitase todo el trabajo posterior. Para ello se han desarrollado dos vectores retrovirales que portan los genes de la β -rec y de la Egfp: en uno de ellos la expresión de las dos proteínas se produce por separado, a partir de las dos orf independientes en un mismo mRNA (separados por un IRES), y en el otro ambas proteínas se han producido como una fusión, un único producto proteico, donde la polaridad de la fusión ha sido idéntica a la construcción previa, el carboxilo de la β -rec con el amino de la Egfp. Ambas construcciones han demostrado producir proteínas perfectamente funcionales en numerosas líneas celulares establecidas y primarias, sin que hayamos detectado diferencias entre ellas en cuanto a actividad o a localización subcelular.

La eficacia de la transducción en la línea celular murina NIH-3T3, la más utilizada en este trabajo, ha sido siempre superior al 95%, demostrando la eficacia de este método rápido y sencillo de transducción de células eucariotas (Abad et al., 2002); la transducción también alcanzó niveles muy aceptables (hasta un 60%) en células primarias de ratón. Estos datos permiten afirmar que estos nuevos vectores de expresión de β -rec proveerán de un gran potencial a los experimentos futuros en cuanto a niveles y dianas de transducción, y sugiere que probablemente también pueda expresarse nuestra recombinasa a través de otros sistemas virales alternativos, lo que le conferirá nuevas y diferentes propiedades.

1.2. Vectores que portan el sustrato de recombinación

La obtención de vectores retrovirales que llevasen nuestra construcción sustrato abriría muchas posibilidades futuras a nuestro sistema, pues proporcionaría una manera muy sencilla, rápida y efectiva de integrar el sustrato de recombinación en numerosas líneas celulares, acortando el tiempo de experimentación incluso en la obtención de líneas murinas transgénicas. Sin embargo, ninguno de los dos modelos que desarrollamos permitió la expresión condicional a la recombinación del gen marcador, aunque por motivos distintos en cada caso:

En la primera estrategia la intención era que, colocando tras el promotor viral dos genes (orf) en tándem pero no fusionados, obtuviésemos la proteína derivada del primer gen pero no la del segundo, y que éste segundo se pudiese expresar tras la RAGE diseñada (Fig. 12). El razonamiento era que la maquinaria celular terminase de traducir la primera proteína y no fuese capaz de reconocer el codón de iniciación de la segunda orf, dejándolo sin traducir. Esto nos permitiría colocar una construcción de activación génica dependiente de recombinación (RAGE). Lamentablemente esto no fue lo que pasó y pudimos observar

una expresión altísima de la segunda proteína tanto en la línea empaquetadora como en la línea diana. Los niveles tan altos dejaban fuera la posibilidad de un escape, que hubiésemos podido intentar reducir, y nos indicaban que la célula era perfectamente capaz de traducir un segundo gen aunque no dispusiese de un sitio específico de entrada del ribosoma (IRES), canónico.

En la segunda estrategia colocamos el gen marcador, bajo el control de su propio promotor, en sentido contrario a las secuencias retrovirales. Para evitar que los procesos replicativos y transcripcionales del virus interfiriesen con la transcripción de nuestro gen, utilizamos el esqueleto de un vector autoinactivante (SIN), que durante su integración inactiva su promotor y secuencias reguladoras, y queda únicamente como vehículo del ADN introducido en su secuencia, el cual está bajo el control de su propio promotor (Fig. 13). Desgraciadamente, y aunque en las células empaquetadoras si tuvimos una alta expresión, en las células diana no logramos detectar en absoluto nuestro gen marcador, lo cual nos indicaba que una vez integrada en el genoma celular, nuestra construcción no era funcional, presumiblemente porque el promotor en antisentido quedaba inactivado.

2. PAPEL DEL COFACTOR DE REACCIÓN HMG1

Los estudios *in vitro* realizados con la β -rec mostraban la necesidad de un/unos cofactor/es de reacción, típicamente HU o Hbsu, proteínas procariotas. Al tratarse de una enzima de origen procariota, era posible que el entorno eucariota no tuviese análogos de estos factores proteicos necesarios a la reacción y que, por tanto, ésta no tuviese lugar. Sin embargo, al comienzo de este trabajo se demostró la funcionalidad *in vitro* de la β -rec empleando como cofactor de la reacción la proteína eucariota HMG1 y, más aún, se vio que la β -rec era perfectamente funcional *in vivo* en células eucariotas (Díaz et al., 1999), lo que constituía un antecedente importante y prometedor de la potencial aplicabilidad del sistema en el entorno eucariota, al menos a nivel de línea celular.

En primer lugar, quisimos ahondar un poco más en el estudio de los cofactores de reacción y analizamos la recombinación en un tipo celular murino (MEF) deficiente en HMG1. Utilizando el vector retroviral vector de expresión de β -Egfp, transdujimos en paralelo MEF wt y HMG1ko y, tras electroporar en ambas líneas el vector portador del sustrato de la reacción, confirmamos por PCR la presencia de producto recombinado en ambos tipos celulares (Fig. 14). Por otra parte, la cuantificación del producto de recombinación mediante PCR semicuantitativa no reveló diferencia significativa entre los dos tipos celulares, lo que nos asegura que, aunque *in vitro* la proteína HMG1 es suficiente e imprescindible para que la reacción de recombinación se produzca, en su ausencia la célula eucariota dispone de otro u otros factores que realizan la misma función de manera plenamente satisfactoria.

Es de destacar también que se encontró que la sobreexpresión de HMG1 aumentaba ligeramente la eficacia de la recombinación en sustratos episomales (en sustratos integrados en la cromatina su efecto fue despreciable), lo cual fue muy posiblemente debido al efecto potenciador que tiene HMG1 respecto a ciertos promotores, entre ellos el CMV o el SV40 (Naghavi et al., 2003; Zappavigna et al., 1996), pues fue éste último el que portaba la construcción respondedora utilizada en esos experimentos.

Los experimentos realizados han demostrado que el nivel fisiológico de expresión de HMG1 en el entorno eucariota (del orden de un millón de copias por célula) (Yang et al., 2005) es más que suficiente para que la reacción de RES mediada por la β -rec ocurra sin aparente limitación.

A este respecto, debemos destacar que HMG1 pertenece al grupo de proteínas de alta movilidad (HMGB), grupo muy numeroso, prácticamente idéntico en todos los mamíferos y con representantes en todos los organismos eucariotas (Bustin and Reeves, 1996). Esto garantizaría *a priori* la funcionalidad del sistema de recombinación específico de secuencia mediado por la β -rec en cualquier otro organismo y por supuesto en cualquier

tipo celular murino en el que se desee modificar el genoma.

3. MODELO DE ACTIVACIÓN GÉNICA MEDIADA POR RECOMBINACIÓN (RAGE)

Aprovechando los vectores retrovirales contruidos, que portaban la β -rec, y sabiendo que el entorno eucariota proveía de todos los requerimientos de la reacción de recombinación, elaboramos un sistema de RAGE con la luciferasa como gen marcador que nos permitiese cuantificar la reacción de RES.

El porcentaje de células transducidas fue siempre superior al 90%, recalando la gran eficacia de los vectores retrovirales de alto título infectivo en relación a los vectores episomales clásicos. Estudiamos en primer lugar la localización de la β -rec a nivel subcelular, para descartar que el entorno retroviral pudiese afectar a su distribución de alguna manera. No observamos ninguna variación, comprobando que la β -rec mantenía su localización nuclear en agregados presumiblemente de heterocromatina.

Este sistema resultó perfectamente funcional, y no detectamos ningún escape en la reacción en ausencia de β -rec en los experimentos donde las células habían integrado la construcción sustrato de forma estable en su genoma. Si bien es cierto que se logró aumentar la expresión del gen marcador en algo más de 10 veces, los valores no alcanzaron en ningún caso los del control positivo, donde se expresaba la luciferasa de forma constitutiva, y donde los niveles eran 30 veces superiores a los del control basal (Fig. 17). Estos resultados pueden ser atribuidos al diferente número de copias integradas o a una insuficiente duración del estudio para recombinar el sustrato, total o parcialmente.

Para analizar este último punto más en profundidad y cuantificar la reacción seleccionamos clones celulares estables al sustrato, cada uno con un número diferente de copias integradas en su cromatina y los transdujimos con el vector que portaba la fusión β -Egfp. En todos los clones analizados se pudo observar producto recombinado, aunque en diferente extensión, alcanzándose en algún caso un aumento en la expresión del marcador de algo más de 10 veces, como en los experimentos anteriores. Se determinó claramente que los clones tenían diferente número de copias y que existía una relación directa entre nº de copias y nivel de expresión de luciferasa (Fig. 18).

De cualquier modo la recombinación no era completa, y quisimos determinar si esto pudiese correlacionar con el nivel de expresión de la β -rec. El porcentaje de células positivas a la β -rec fue variable, en general mayor del 90%, pero algún caso con sólo algo más de un 60% de la población, y tras purificar por FACS las poblaciones positivas a la recombinasa determinamos de nuevo la tasa de recombinación. En un caso partimos ya del producto completamente recombinado y en otro caso tras la purificación logramos el 100% de recombinación. Sin embargo en el último clon (C10), a pesar de que toda la población expresaba la recombinasa, no logramos aumentar significativamente el porcentaje de recombinación, y quisimos determinar el porqué (Fig. 19).

4. ANÁLISIS DE LA IRREVERSIBILIDAD DE LA REACCIÓN DE RESOLUCIÓN

Para su estudio generamos subclones que no habían alcanzado la recombinación total. Eran subclones de un clon del sustrato, es decir, iguales en cuanto al sustrato de recombinación pero diferentes en las copias de β -rec que tenía cada uno. En ellos examinamos las tres posibilidades que explicarían nuestro resultado, que eran:

- La inaccesibilidad del sustrato a la β -rec: de este modo las copias del sustrato que eran inaccesibles nunca conseguirían recombinar, llegándose a un punto, semejante en todos los subclones, donde no habría más recombinación por mucho tiempo que pasase y aumentase el nivel de β -rec.

- La expresión insuficiente de recombinasa: si ésta era la explicación, al irse acumulando la β -rec en la célula, ésta sería capaz de recombinar todo el sustrato en un mayor o menor plazo de tiempo, en función del número de copias de la β -rec presentes en cada subclon. Este caso incluye también la posibilidad de que alguna de las copias de la β -rec de algún subclon esté silenciada o no sea activa, por lo que a todos los efectos es como si no se hubiese integrado.

- La reversibilidad de la reacción de RES mediada por la β -rec. La reacción de resolución es teóricamente irreversible, pues β no cataliza reacciones intermoleculares. En eucariotas esto podía ser diferente y, aunque no resultaba lógico tal cambio en el mecanismo de acción de una enzima sólo por pasar de procariotas a eucariotas, era una opción que debíamos valorar. Si fuese ésta la explicación, lo que encontraríamos con el paso del tiempo era un equilibrio diferente en cada clon en cuanto al porcentaje de sustrato recombinado y sin recombinar.

Realizamos el estudio de la recombinación durante siete semanas recogiendo muestras en las últimas cuatro. Como la primera muestra se tomó del clon original, cuando se pudieron analizar los subclones (aproximadamente al mes de comenzar el experimento, pues éste fue el tiempo necesario para su crecimiento) algunos de ellos ya habían recombinado completamente y en los demás la tasa de recombinación había aumentado en mayor o menor medida. En la última muestra vemos como otro subclon más ha recombinado completamente y en los que aún tienen una fracción sin recombinar, ésta va disminuyendo con el tiempo (Fig. 20).

Estos resultados excluían dos de las tres posibles explicaciones al fenómeno observado en este clon. La única posibilidad que quedaba, y con ello la explicación a lo que estaba ocurriendo, era que el factor limitante a la recombinación era el nivel de β recombinasa, insuficiente en el momento de comenzar el estudio pero que iba aumentando conforme se iba acumulando en cada subclon hasta llegar al punto en que era capaz de recombinar todas las copias del sustrato.

La determinación en cada subclon, tanto de los niveles de β -rec como de los de luciferasa, confirmó esta conclusión, pues los subclones que no lograban el 100% de recombinación eran los que tenían una menor expresión de β y también una menor inducción de luciferasa. El estudio se interrumpió a las 7 semanas, pero asumimos que en caso de haberse continuado, hubiésemos visto alcanzar el 100% de recombinación a los dos subclones que quedaban por alcanzarlo.

5. DESARROLLO Y UTILIDAD DE MODELOS INDUCIBLES DE RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA

En este trabajo se han generado dos construcciones inducibles de la β -rec: una que genera una proteína doble de fusión (la β -rec fusionada por su extremo carboxilo al extremo amino del LBD del AR) y además la Egfp, que se traduce de forma independiente, y otra que genera una proteína triple de fusión (donde la Egfp se encuentra fusionada por su extremo amino a la β -rec y por el carboxilo al LBD del AR).

En ambos sistemas se confirmó que, en condiciones basales, la recombinasa permanecía retenida en el citoplasma por efecto de la unión del LBD a proteínas del grupo de las HSP. Tras la adición del ligando mibolerona, éste se unía al LBD, cambiando su conformación y liberando a la proteína de fusión de su anclaje citoplásmico; esto permitía

que las fusiones de β -rec traslocasen al núcleo celular y ejerciese su función.

Se trataba del primer modelo inducible para la β -rec, y lo primero que teníamos que demostrar era su potencial en este campo, su capacidad de ser incluida en estos modelos. A este respecto, tanto la β -rec de los sistemas doble y triple como la Egfp en el sistema doble resultaron perfectamente funcionales: La proteína β conseguía recombinar el sustrato tras la adición del ligando y la Egfp emitía su fluorescencia.

Estudiamos la recombinación optimizando las condiciones de inducción, resultando los mayores niveles al utilizar el ligando a una concentración 10^{-8} M durante un período variable, en general de 6 días (Fig. 22).

La evaluación de la funcionalidad de un sistema inducible viene determinada no solo por los niveles de inducción alcanzados, sino también por el fondo de expresión que presenta. En este sentido, los valores absolutos de expresión de luciferasa (datos no mostrados) señalaron que mientras que en el caso de la proteína doble sus niveles basales (no inducidos) permanecían en un rango muy bajo (semejante al control negativo del modelo de RAGE anteriormente visto), implicando una buena regulación, los niveles basales del sistema triple estaban muy aumentados y llegaban en ocasiones a alcanzar los del sistema doble en su forma inducida. Ésto nos indicaba que aunque ambos modelos resultaban funcionales, el sistema triple no presentaba una correcta regulación en ausencia del ligando. Estos datos correlacionaban perfectamente con los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia:

- En el sistema doble, en ausencia de ligando la proteína doble permanecía en el citoplasma en gran medida y una pequeña fracción en el núcleo en forma inactiva, mientras que tras la adición de mibolerona la proteína doble traslocaba en un gran porcentaje al núcleo en forma de agregados activos, mientras que una pequeña fracción de la misma y la Egfp aún permanecían en el citoplasma (Fig. 23).
- En el sistema triple ya antes de la inducción una gran parte de la proteína triple se encontraba en el núcleo celular en forma de agregados presumiblemente activos, y una vez inducida lo que quedaba por traslocar lo hacía completamente, quedando vacío el citoplasma (Fig. 24).

Estos modelos inducibles han sido utilizados previamente por otros grupos de investigación en fusiones a las recombinasas Cre y FLP, y en ellos se han conseguido unos niveles de inducción semejantes a los nuestros (Kaczmarczyk and Green, 2001, 2003) o aparentemente superiores (Angrand et al., 1998; Buchholz et al., 1996; Logie and Stewart, 1995).

Merece la pena destacar los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la expresión proteica por WB (Fig. 25):

Vemos claramente como, tras la adición del ligando, la cantidad absoluta de proteína celular baja. Esto ocurre únicamente con las proteínas de fusión, tanto la doble como la triple, y no ocurre con la Egfp en el sistema doble, cuya traducción es independiente a la de la proteína de fusión. Esto solo puede indicar que hay una mayor degradación proteica. Este resultado está en concordancia con las conclusiones de otros grupos, que indican que la estabilidad del AR en gran medida depende de las interacciones N/C (interacciones entre los extremos amino y carboxilo), de modo que si no se dan esas interacciones la tasa de disociación con el ligando y la de degradación aumentan unas 3 y 6 veces respectivamente (He et al., 2001; Zhou et al., 1995).

En nuestro caso, al no existir dichas interacciones fisiológicas, no sólo desaparece el efecto estabilizador del ligando, sino que la proteína se disocia de su ligando y se degrada con mucha más rapidez, permitiendo únicamente una moderada inducción de la RES.

PARTE II: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS MURINOS CONDICIONALES

Los ratones modificados genéticamente son una herramienta esencial para el estudio de las vías moleculares de los procesos fisiológicos y patológicos que controlan la expresión génica, tanto en el estado embrionario, como en el desarrollo o el estado adulto (Yu and Bradley, 2001). La similitud genética de ratones y humanos, la disponibilidad en el entorno murino de sofisticadas herramientas de manipulación génica basadas en la RES y otras tecnologías novedosas y por último la flexibilidad que ofrecen las ES murinas hacen del ratón un modelo único en la investigación biomédica (Belizario et al., 2012; Bockamp et al., 2002). Lo que se espera finalmente es poder determinar la contribución de cada gen al desarrollo del animal y a los múltiples procesos patológicos en estudio (Capecchi, 2005; Hardy et al., 2010).

En este trabajo, nos propusimos generar dos modelos murinos de modificación génica condicional empleando el sistema de la β -rec, de modo que si resultaban funcionales, pudiese incluirse este sistema entre las herramientas que dispone la comunidad científica para la generación de organismos modificados.

6. MODELO DE TRANSGÉNESIS AL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN (Tgrec)

Disponíamos de una línea murina de transgénesis a la β -rec que había resultado perfectamente funcional (Servet et al., 2008), por lo que en la generación del modelo de transgénesis al sustrato de recombinación (Tgrec) elegimos llevarlo en una construcción semejante. Esta construcción lleva el fragmento a introducir tras el promotor proximal del gen *Lck*, y tras la RES se permitiría la expresión del gen de la β -galactosidasa, situado tras el casete de recombinación. Tras cruzar las dos líneas murinas para la obtención de los ratones doble transgénicos (Tgrec/Tg β), la expresión de la β -rec se limitaría a los linfocitos T, y tras la RES sería en éstas mismas células donde se expresaría también el gen marcador.

Tras comprobar la construcción *in vitro*, realizamos un estudio preliminar *in vivo* en la línea celular Jurkat (Fig. 27); al ser una línea celular de linfoma, el *Lck* estaría activo y podríamos detectar expresión de β -galactosidasa tras la RAGE. Sin embargo, tras electroporar el sustrato y transducir las células con la β -rec no logramos detectar la tinción azulada esperada. Descartamos que la secuencia del gen de *LacZ* de la construcción sustrato estuviese mutada, lo que hubiese explicado la ausencia del marcador, por electroporación del producto recombinado en la línea Jurkat: allí si vimos perfectamente la tinción citoplasmática de la β -galactosidasa.

La ausencia de tinción podía ser entonces debida a una baja eficiencia de la electroporación del sustrato o de la transducción retroviral de la β -rec. Por estudios previos era más probable que el factor limitante fuese la electroporación, pues los vectores retrovirales habían dado siempre unos valores de transducción muy altos (mínimo del 60% y en general de más de un 90%); también podía estar ocurriendo una tasa baja en la eficacia de la reacción de recombinación, debido tanto a efectos de silenciamiento por posicionamiento, como a una dosis insuficiente de recombinasa o a un lapso temporal insuficiente para la reacción.

De cualquier modo la cantidad de proteína marcadora producida no fue suficiente para su observación directa, aunque la construcción era funcional. Decidimos seguir adelante con el desarrollo del modelo.

Se introdujo la construcción por microinyección y se logró establecer la línea murina

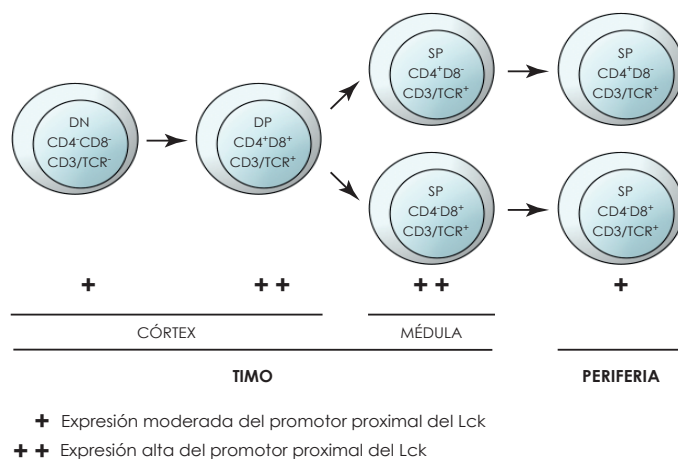
Tgrec, que en heterocigosis no presentó ninguna alteración fisiológica. Como hemos dicho, el promotor Lck es exclusivamente activo en la poblaciones linfocitarias, con lo cual hicimos un estudio citométrico de dichas poblaciones tanto de timo como de bazo y ganglios linfáticos; no era probable que encontrásemos ninguna alteración de las mismas, pues nuestra construcción contenía como gen activo antes de la recombinación únicamente al gen de resistencia a la puomicina, pero no podíamos descartar algún efecto del promotor Lck *upstream* de algún gen endógeno que se viese afectado, o algún efecto mutacional en el lugar de inserción del transgen que no estuviese rescatado fenotípicamente.

Como se ve en la figura 29, las poblaciones linfocitarias tanto de linfocitos B como de linfocitos T fueron completamente normales y no presentaron ninguna alteración ni desproporción entre ellas.

Quisimos probar la eficacia de los vectores retrovirales que portaban la β -rec en una diana primaria (los linfocitos T de los animales Tgrec; LT), lo que además nos permitiría confirmar la funcionalidad del sistema *in vivo*, que no fue posible en la línea celular Jurkat. Los niveles de transducción que obtuvimos fueron del orden del 30%; son valores mucho menores que en el caso de las líneas celulares transformadas pero acordes con los valores que se obtienen en células primarias (Abad et al., 2002). Tras la transducción de los LT verificamos que tanto la recombinasa como la Egfp tenían la distribución celular esperada y se analizó el nivel de recombinación: mediante ensayos de PCR pudimos detectar la banda propia de la RES, la cual, a pesar de ser minoritaria, nos indicó que el lugar de integración del transgen era accesible a la β -rec y que el sistema era funcional (Fig. 31).

El análisis de los ratones doble transgénicos (Tgrec/Tg β) fue realizado comenzando por el estudio de la recombinación en órganos totales, y luego fuimos purificando las poblaciones celulares hasta llegar a la separación y análisis de las diferentes poblaciones de LT: DP (CD4⁺/CD8⁺), SP (CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺) y DN (CD4⁻/CD8⁻). Con ello queríamos evaluar si había diferencias en la tasa de recombinación en las distintas poblaciones y si ésta correlacionaba con los niveles de actividad del promotor Lck en las diferentes etapas de maduración de los LT.

Se ha determinado que el promotor proximal del Lck es activo en linfocitos T, pero no en todas las etapas de su maduración, como se puede ver en la figura 49: comienza su actividad en la etapa de DN (CD4⁻/CD8⁻) y permanece activo durante la diferenciación en el timo en la etapa de DP (CD4⁺/CD8⁺); una vez que los LT han acabado de madurar y son SP (CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁺), salen del timo a los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios periféricos) y la actividad del promotor disminuye significativamente (Buckland et al., 2000; Shimizu et al., 2001). Aun con su actividad disminuida, estos autores son capaces de detectar, en linfocitos T periféricos, una alta expresión del producto génico derivado del promotor, así como una cierta cantidad de su transcrito. Esto está en discrepancia con conclusiones previas de otros autores (Allen et al., 1992; Wildin et al., 1991), las cuales indicaban que el promotor proximal del Lck disminuía su actividad en timocitos maduros SP y quedaba prácticamente inactivo en linfocitos periféricos.



En un primer análisis de órganos completos encontramos que en los animales doble transgénicos (Tgrec/Tg β) tanto en timo como en bazo y ganglios se estaba expresando la β -rec y se estaba dando recombinación, siendo ambos procesos inexistentes en hígado, cerebro o en tejido de cola de esos mismos ratones o en todos los órganos analizados de los ratones control, transgénicos sólo al sustrato (Tgrec). Cabe destacar que la expresión de la β -rec en los animales doble transgénicos, aunque fue en todos los casos mayor en el timo, siempre se detectó en una cantidad muy significativa en los órganos linfoides secundarios (Fig. 33). Esto está en concordancia con el patrón de expresión detallado en los trabajos previos (Buckland et al., 2000; Shimizu et al., 2001). Además, nuestros resultados pueden estar relacionados con el sitio de integración del transgen o la propia estructura del vector. Se ha publicado que el promotor proximal del gen Lck puede verse afectado por el sitio de integración (Buckland et al., 2000); esto confirma los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con las dos líneas transgénicas a la β -rec (Tg β), donde la enzima se encuentra bajo el control del pLck; en una de ellas la expresión de la β -rec es muy escasa, mientras que en la otra ni siquiera se detecta (Servet et al., 2008).

Según los métodos que fuimos empleando en la separación de las distintas poblaciones linfocitarias (enriquecimiento de linfocitos B por MACS, enriquecimiento de linfocitos T por SpinSep y purificación de las diversas subpoblaciones de linfocitos T por FACS), unos tipos celulares se enriquecían más que otros, de modo que para asegurar la mayor pureza de un tipo, siempre había otro tipo celular que quedaba "contaminado" por el primero; de este modo fuimos enriqueciendo gradualmente la banda de recombinación (Fig. 34). Finalmente, cuando purificamos las distintas poblaciones de LT de timo, bazo y ganglios linfáticos por FACS (DP, SP y DP), encontramos diferencias significativas (Fig. 35). En el timo, mientras la población DN no había recombinado prácticamente nada, la fracción DP había recombinado en un porcentaje apreciable (aunque menor del 50% del sustrato) y la fracción SP había recombinado la mayor parte del sustrato. En bazo y ganglios la fracción SP mostraba una recombinación prácticamente total y la fracción DN, es decir, las células que no eran LT (el bazo contiene un 30% de linfocitos B; LB), no tenía apenas banda de recombinación.

Estos resultados no concuerdan exactamente con el patrón de expresión y actividad del pLck de los primeros experimentos (Allen et al., 1992; Wildin et al., 1991), pero sí con los experimentos posteriores (Buckland et al., 2000; Shimizu et al., 2001). En cualquier caso, y recordando lo ocurrido en el modelo de RAGE *in vitro*, intuimos que estamos observando un fenómeno similar: la β -rec se expresa y va recombinando su sustrato, pero es necesario un tiempo para que pueda acumularse en la célula a un nivel que le permita recombinar todas las copias del sustrato. Así, aunque en las poblaciones DN ya exista expresión de β -rec, ésta probablemente no es capaz de recombinar una fracción detectable de sustrato; en la población DP ya tenemos una fracción apreciable recombinada y en las SP la fracción recombinada ya es mayoritaria en la población.

En los órganos linfoides secundarios, el descenso de la actividad del promotor conlleva una menor expresión de β -rec, pero la que se produce es suficiente para que, junto a la que ya se encuentra en la célula (recordemos que la reacción catalizada por la β -rec es irreversible), se alcance la tasa de recombinación detectada en estas células.

Se analizó además la recombinación en LT activados. Queríamos evaluar si la maquinaria que se ponía en marcha en la activación de los mismos incrementaba la actividad de nuestro promotor y conseguía en el tiempo del ensayo que recombinase el 100% del sustrato. En los análisis por PCR la banda del producto no recombinado desapareció completamente, pero en los resultados mostrados en los *Southern Blot* detectamos aún una banda muy débil a la altura del sustrato no recombinado. Estos resultados apuntan hacia el mantenimiento de una moderada actividad del pLck en este tipo celular (Fig. 35).

Por último quisimos aprovechar la presencia del gen marcador, *LacZ*, para analizar la recombinación mediante la detección de su producto génico, la β -galactosidasa, en las células que habían sufrido RES. Lamentablemente, al igual que ocurrió en la línea celular Jurkat, no fuimos capaces de conseguir una tinción celular clara en los LT de los animales doble transgénicos. Realmente no sabemos el motivo, pues el gen expresa la proteína en

forma activa, como se demostró anteriormente. La explicación más evidente es que, al no tener el promotor una funcionalidad plena, no se produce tanta β -galactosidasa como para verla a simple vista, mientras que en los ensayos por PCR y *Southern Blot*, más sensibles, sí logramos detectarla.

Para confirmar esta teoría empleamos anticuerpos específicos contra la β -rec y la β -galactosidasa en un ensayo de inmunofluorescencia. En este caso sí que detectamos claramente ambas proteínas de forma exclusiva en los LT de los animales Tgrec/Tg β : la β -rec mostraba su localización punteada nuclear característica y la β -galactosidasa se veía difusa por el escaso citoplasma linfocitario, como era de esperar (Fig. 36).

Es de destacar que la empresa Taconic (Taconic Biosciences) distribuye una línea murina de Cre bajo el control del promotor proximal Lck (<http://www.taconic.com/transgenic-mouse-model/Lck-cre-transgenic>), en la cual el patrón de expresión de la recombinasa específica de secuencia Cre concuerda perfectamente con nuestros resultados.

7. MODELO DE KNOCKOUT CONDICIONAL DEL SUSTRATO DE RECOMBINACIÓN (KOsix)

El objetivo de la generación de este modelo era la misma que la del transgénico al sustrato de recombinación: analizar la presencia de recombinación en los órganos de expresión de la β -rec de los animales doble transgénicos (KOsix/Tg β). De este modo testaríamos el sistema β /six en el entorno murino de las dos maneras más comunes de modificación, intentando demostrar su aplicabilidad (Fig. 45).

La diferencia con el modelo anterior era que mientras en ese el transgen se introducía aleatoriamente en el genoma en un número variable de localizaciones y copias, en éste se introduciría una sola copia del sustrato de recombinación en un lugar predeterminado del genoma.

Con este modelo buscábamos demostrar la funcionalidad de nuestro sistema (se trataba del primer modelo de KO condicional de β), así que no quisimos complicar el objetivo con la generación y caracterización de un KO condicional nuevo, pues nos arriesgábamos a elegir una construcción que una vez integrada no fuese accesible a la enzima. Por tanto basamos nuestro vector de *targeting* en el de un modelo previo que ya había demostrado su accesibilidad a la recombinasa Cre (Bouvier et al., 1996). En este modelo, la recombinasa se administraba a las células ES que tenían integrado el sustrato de reacción, de modo que era tras la RES y selección de los clones recombinados cuando éstos se utilizaban en la generación de la línea murina.

En nuestros modelos la β -rec se encontraba bajo el promotor proximal del gen Lck en una línea murina (Tg β , ya descrita) y, tras su cruce con nuestra línea KO condicional (KOsix), recombinaría su sustrato en los LT de la descendencia doble transgénica (KOsix/Tg β).

Como se puede ver, el procedimiento no era el mismo en ambos casos, pero como hemos mencionado anteriormente, el hecho de que la recombinasa Cre fuese activa y consiguiese recombinar su sustrato en un tipo celular tan restrictivo como son las ES nos daba bastantes garantías de que en los LT la β -rec estuviese activa y tuviese accesible su sustrato (nuestros dos modelos murinos se desarrollaron prácticamente a la vez, así que en el momento de comenzarlos no sabíamos si la β -rec era activa en el entorno murino).

La construcción sustrato llevaba un casete de recombinación consistente en un gen de resistencia a neomicina flanqueado por dos sitios six en orientación directa, lo que resultaría en su delección en caso de sufrir RES. A cada lado se clonaron los brazos de homología del *enhancer* de la cadena β del receptor de los linfocitos T (TCR β e) y, externamente el gen TK, de selección negativa.

Realmente esta construcción, una vez integrada en el genoma y en homocigosis, ya genera una deficiencia en el TCR β , pues el *enhancer* ha sido sustituido por nuestro casete de recombinación, así que no es propiamente dicho un KO condicional. El fenotipo ocasionado por la deficiencia en el TCR β lo veremos ya en los ratones sustrato homocigotos sin necesidad de cruzarlos con los transgénicos a la β -rec. Lo que queremos determinar en este trabajo es si nuestro sistema es funcional, y eso lo veríamos en la descendencia doble transgénica.

Lo primero que tuvimos la oportunidad de analizar fue la eficacia de transfección de los diferentes vectores de la β -rec en las células ES (Tabla 2): vimos que la eficacia de todos ellos bajaba muchísimo en comparación con los datos en una línea transformada, y más específicamente el vector retroviral que tan buenos resultados nos había dado hasta ahora; aquí no parecía que tuviese capacidad de transducción en absoluto. Esto era debido al silenciamiento génico que ocurría tras la integración del transgen, y posteriormente se han conseguido unos niveles de transducción muy elevados en ES utilizando vectores lentivirales o retrovirales optimizados a este tipo celular (Chilton and Le Doux, 2008; Psarras et al., 2004).

Destacamos también que la eficacia de los vectores episomales que llevaban únicamente la Egfp (frente a los que llevaban la fusión β -Egfp) fue siempre mucho mayor, lo cual recalca lo restrictivo que es este tipo celular en cuanto a la expresión y procesamiento de proteínas de mayor complejidad. Además no debemos olvidar que la β -rec no estaba optimizada para su expresión en eucariotas.

Mientras tanto habíamos obtenido varios clones de ES positivos a la construcción sustrato y, en paralelo a su agregación para la obtención de la línea murina KOsix, se electroporaron con el vector de expresión de la β -rec, analizando la presencia de RES. El producto recombinado fue visible, aunque de manera leve, en la población positiva purificada por FACS; aunque fuese con baja eficiencia, detectamos recombinación, lo que demostraba que la β -rec era activa en células ES en un sustrato integrado en la cromatina (Fig. 39). Que la recombinación no fuese mayor podía deberse al tipo celular o al insuficiente tiempo del estudio, como había ocurrido anteriormente.

Una vez establecida en homocigosis la línea murina KOsix, quisimos comprobar que su fenotipo se correspondía con el publicado para el caso de Cre. Aunque en nuestro caso nuestro casete aún no había recombinado, la alteración en el desarrollo linfocitario debería estar ya presente, pues carecían del *enhancer* del TCR β . Anteriormente hemos visto en líneas generales el desarrollo de los linfocitos T, y mediante un estudio citométrico pudimos confirmar que nuestros resultados eran los esperados (Fig. 42): mientras que en los ratones wt y los KOsix heterocigotos los valores de todas las poblaciones linfocitarias eran normales, en las muestras de los ratones KOsix homocigotos se apreciaba una disminución moderada de los linfocitos T DP y una ausencia prácticamente total de los SP, tanto en timo como en bazo y ganglios linfáticos. Esto afectaba lógicamente a la proporción LB/LT de los órganos linfoides secundarios; esto se aprecia de manera especialmente notoria en ganglios, donde confirmamos una disminución muy acentuada en el porcentaje de CD3 $^{+}$ frente a B220 $^{+}$; en bazo el porcentaje de células CD3 $^{+}$ baja en gran medida, pero se nota menos al no ser tan abundante su población. La presencia en timo de una población todavía considerable de DP la atribuimos a la población precursora de linfocitos T que muestra aún el pre-TCR β o que se encuentra en un estado pre-apoptótico. Respecto al análisis de las dos poblaciones de TCR, podemos ver claramente cómo desaparece completamente la población TCR $\alpha\beta$ mientras la población TCR $\gamma\delta$, prácticamente inexistente en los ratones wt y heterocigotos, aumenta considerablemente en los homocigotos al sustrato, como tratando de compensar la carencia de LT, pero lográndolo sólo parcialmente.

El estudio histológico del timo (Fig. 41) demostró una gran reducción del grosor y celularidad de la zona cortical y una disminución también muy importante en la densidad celular y cohesión de la zona medular. Estos resultados son debidos a la gran deficiencia linfocitaria de estos ratones, lo que hace que el timo tenga una baja densidad celular *per se*. Por otra parte, en el mantenimiento de la correcta estructura del timo es necesaria la interacción de diversas quimioquinas entre las células epiteliales del timo y los linfocitos T, por lo que al haber menos linfocitos, el timo también se ve afectado de esta manera

(Anderson and Takahama, 2012; Rezzani et al., 2008).

En este punto del trabajo quisimos, al igual que en el otro modelo de transgénesis murina, analizar la recombinación en los linfocitos T primarios de los ratones homocigotos tras su transducción con el vector retroviral de la β -Egfp. En este caso alcanzamos valores de transducción mayores, y aunque la banda de RES se detectaba claramente, no era mayoritaria (Fig. 44). Además de la posibilidad, siempre presente, del insuficiente tiempo del análisis, el estado inactivo propio de los linfocitos T periféricos podía también ser parte de la explicación, pues el sustrato podía no tener una buena accesibilidad a la β -rec.

En la parte final del estudio determinamos la funcionalidad del sistema β /six en los ratones doble transgénicos (KOsix/Tg β), donde concurrían dos factores:

La β -rec, bajo el promotor proximal del gen *Lck*, se expresaría en los linfocitos T en los estadios de DN y DP, y quedaría inactiva ya en el estado maduro de SP.

El sustrato de la recombinación estaría en uno solo de los alelos del ratón, pues el otro alelo provendría de la línea transgénica a la β -rec, por lo que tendría inalterado el *enhancer* del TCR. El hecho de ser heterocigoto a la construcción sustrato es lo que permitía a la descendencia doble transgénica desarrollar por un lado las diferentes poblaciones linfocitarias de forma normal y por el otro expresar la β -rec y recombinar su sustrato en dichas poblaciones linfocitarias.

Lo primero que analizamos fueron los órganos totales: aquí ya pudimos detectar la presencia de banda de recombinación, pero siempre de forma minoritaria. En este modelo murino realizamos las mismas etapas que en el anterior en cuanto a la purificación de las poblaciones linfocitarias: primero enriquecimos la fracción de linfocitos B mediante MACS, luego enriquecimos la fracción de linfocitos T mediante SpinSep y finalmente purificamos las diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante FACS:

Tras la separación por MACS en el bazo vimos prácticamente desaparecer la banda recombinada en la fracción purificada de linfocitos B y aumentar la recombinada hasta ser mayoritaria en la fracción enriquecida en células T.

Tras el enriquecimiento en linfocitos T por SpinSep la población tímica DN se mostró poco recombinada, la DP+SP mayoritariamente recombinada y entre las poblaciones del bazo, en los DN aparecía una muy leve banda recombinada y en los SP la práctica totalidad del sustrato se encontraba en su forma recombinada, salvo otra ligerísima banda a la altura de no recombinación (Fig. 47b); la presencia residual de sustrato recombinado y no recombinado en las respectivas fracciones DN y SP la atribuimos a la metodología propia empleada en el enriquecimiento.

Tras la separación por FACS el porcentaje de pureza de las distintas poblaciones celulares era prácticamente del 100%. Aquí el grado de recombinación observado se correspondería con el grado de recombinación efectivo, sin artefactos. Nos encontramos que en el timo la población DP tenía una banda mayoritaria no recombinada y la población SP una banda mayoritaria recombinada. Respecto a las subpoblaciones de bazo y ganglios, mientras la DN no había recombinado en absoluto, la SP lo había hecho de forma completa (Fig. 48). Estos resultados eran aún más claros que en el otro modelo murino: la β -rec demostraba aquí que era perfectamente funcional en el entorno murino y que lograba recombinar el 100% de su sustrato integrado en el genoma murino de manera específica de tejido y de linaje celular (SP).

Es de destacar que en ningún momento vimos ninguna banda a la altura de la banda de RES, ni en los órganos control de los ratones doble transgénicos, ni en ninguna muestra de los ratones sustrato. Éste es un hecho destacable, porque aunque en algún caso a lo largo de este trabajo la PCR ha amplificado una banda a la misma altura que la de RES, esto deja patente su inespecificidad y su independencia de dicho proceso de recombinación.

En conclusión, los resultados obtenidos con ambos modelos de RAGE *in vivo* (Tgrec/Tg β y KOsix/Tg β) demuestran que el sistema β /six es de aplicación para la manipulación controlada del genoma de mamíferos.

EL SISTEMA β /six: REALIDADES Y RETOS

Desde su definición (Rojo and Alonso, 1994) el sistema β /six ha venido desarrollándose en diversas líneas de aplicación.

Con posterioridad a la realización de este trabajo se confirmó que las proteínas del grupo HMGB (y específicamente HMG1) obtenidas de maíz, podían sustituir *in vitro* o *in vivo* (en una cepa de *B. subtilis*) a Hbsu o a la proteína HMG1 de mamíferos (Stemmer et al., 2002), sugiriendo que el sistema podía funcionar en plantas. Posteriormente Grønlund y col. confirmó este potencial y demostró su versatilidad en plantas de Tabaco y *Arabidopsis* (Grønlund et al., 2007).

El sistema β /six ha sido utilizado con éxito para manipular los genomas de *B. subtilis* (Sanchez et al., 2007), *Aspergillus fumigatus* (Hartmann et al., 2010) y *Neurospora crassa* (Szewczyk et al., 2013, 2014). Estas evidencias, junto con nuestros resultados, sugieren que el sistema β /six puede ser utilizado en un amplio espectro de organismos.

Este trabajo ha demostrado que el sistema β /six es funcional en el entorno murino, tanto *in vitro* (sustratos episomales o integrados) como *in vivo*, sobre sustratos integrados al azar y de número de copia variable (Tgrec), y sobre sustratos de copia única (KOsix) sobre el locus de la cadena β del TCR.

En todos los modelos se ha establecido que parece existir una correlación directa entre el nivel de expresión de β -rec y la tasa de recombinación, siendo éste el factor limitante. La β -rec parece ser bien tolerada por la célula eucariota, por lo que es factible que se pudiese conseguir una mayor expresión de la misma. En aquellas aplicaciones en las que la especificidad de la expresión de la β -rec viene condicionada por un promotor concreto, estamos supeditados a la actividad de dicho promotor.

La primera alternativa a considerar sería adaptar el uso de codones al entorno eucariota y conseguir variantes de mayor actividad catalítica, al igual que se hizo con Cre, mediante evolución molecular (Koresawa et al., 2000; Shimshek et al., 2002).

El trabajo en mamíferos también ha demostrado que la β -rec puede ser fusionada, en su extremo carboxilo, tanto con Egfp como con dominios de unión a ligando (LBD) de receptores esteroideos. La fusión con Egfp es expresada a partir de un vector retroviral, lo que posibilita su actividad y detección de forma muy eficaz y sencilla; la fusión al AR-LBD posibilita el control de su localización subcelular y por tanto su actividad sobre secuencias diana integradas en el genoma. Los resultados obtenidos en este campo son satisfactorios y similares a los descritos en otros modelos (Kaczmarczyk and Green, 2001, 2003).

En el sistema β /six, aunque el modelo de proteína de fusión doble, β -LBD, ofrece un buen nivel de RAGE, es dependiente de ligando (mib) y presenta un bajo nivel basal de expresión, la inestabilización y degradación de la proteína de fusión que se detecta tras la inducción, sugiere que el nivel máximo de recombinación obtenible podría mejorarse con otros módulos de regulación (ER, etc.) que impliquen su inducción con otros análogos hormonales (tamoxifeno, TM), con los que se tiene una amplia experiencia y se encuentran optimizados *in vivo* (Feil et al., 2009; Zhang and Kirsch, 2015).

Adicionalmente es importante resaltar que para la mayoría de los sistemas en uso, se ha demostrado que en el genoma existen pseudositos de reconocimiento (con homología de secuencia) que, con baja eficacia, son utilizados por las recombinasas, provocando alteraciones genéticas indeseadas (deleciones y traslocaciones) (Higashi et al., 2009; Schmidt et al., 2000). Las secuencias six tienen una longitud mayor (90pb); lo que *a priori* podría ser contemplado como una desventaja se convierte en una ventaja, ya que por estudios de homología de secuencias no se encuentran pseudositos six en el genoma de mamífero. Los datos de laboratorio también corroboran esta conclusión, aunque sería necesario un estudio amplio al respecto.

Finalmente, incidir en que actualmente uno de los campos con más desarrollo es

la generación y control de modificaciones múltiples en un mismo organismo. Cada vez es más necesario combinar varias modificaciones para poder demostrar la implicación o las relaciones existentes en las vías de señalización o rutas bioquímicas que controlan los procesos fisiológicos o patológicos. Esto no es sencillo, y se aborda desde diferentes aproximaciones (Zhang et al., 2012):

- La utilización de sitios mutados, mutuamente exclusivos (Langer et al., 2002; Turan et al., 2014).
- El empleo combinado de dos o más sistemas de recombinación (REC1+REC2, etc) (Raymond and Soriano, 2007; Schonhuber et al., 2014).
- La utilización de sistemas condicionales con diferentes módulos de activación o especificidades (REC-LBD, TALERS, etc) (Gaj et al., 2013; Lo Cascio et al., 2014; Ma et al., 2014; Mercer et al., 2012; Platt et al., 2014; Wallen et al., 2015; Zhang and Kirsch, 2015).

El sistema β /six tiene capacidad para ser utilizado en cualquiera de ellas.

CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado vectores retrovirales de alto título que expresan la β -rec en forma de proteína independiente o como fusión a la Egfp. Ambas proteínas han demostrado ser plenamente funcionales. Los vectores son muy eficaces en varias líneas celulares y células primarias, pero no en células madre embrionarias (ES).
2. El entorno eucariota provee del cofactor o cofactores de reacción necesarios para que se produzca la RES mediada por la β -rec: La proteína HMG1 es suficiente para que se produzca la reacción de recombinación *in vitro*, pero la deficiencia en HMG1 no afecta a la tasa de recombinación *in vivo*. Esto implica la existencia de otro(s) cofactor(es) que ejercen la misma función.
3. Se ha desarrollado un modelo de activación génica mediada por recombinación (RAGE) empleando la luciferasa como marcador. Se ha logrado obtener una recombinación total del sustrato, demostrando el potencial de este sistema en líneas celulares murinas.
4. La β -rec es capaz de recombinar completamente sustratos integrados en el genoma, siendo para ello necesario un lapso de tiempo variable en función del sitio de integración y el número de copias integradas, como ocurre en cualquier otro sistema de RES. Es de destacar que hasta el momento no hemos encontrado ningún sustrato inaccesible a la β recombinasa.
5. Se ha desarrollado y validado un modelo inducible de recombinación consistente en proteínas de fusión de la β -rec al dominio de unión de ligando (LBD) del receptor de andrógeno (AR): la proteína doble (β -LBD) cumple con todos los requisitos de un modelo inducible, mostrando utilidad práctica en los casos en que se busque una tasa de recombinación media; la proteína triple (β -Egfp-LBD) será la apropiada en el caso de necesitar tasas de recombinación mayores, pero debe ser optimizada para reducir el fondo (sin inducción) que presenta.
6. Se ha generado una línea murina transgénica al sustrato de recombinación (Tgrec) la cual ha resultado viable y sin alteraciones fisiológicas aparentes. No hemos detectado ningún escape a la RES en los órganos analizados.
7. En ratones doble transgénicos (Tgrec/Tg β), heterocigotos, hemos verificado la correcta funcionalidad del sistema β /six, que recombina el sustrato de forma exclusiva en el tejido de expresión de la β -rec.
8. Se ha desarrollado una línea murina de *knockout* condicional al sustrato de recombinación (KOsix), donde los sitios de reconocimiento se han introducido por *gene targeting*. En este modelo el *enhancer*(ϵ) de la cadena β del receptor de los linfocitos T (TCR $\beta\epsilon$) se ha reemplazado por el casete de recombinación. El fenotipo observado se corresponde con lo esperado.
9. Ratones doble transgénicos (KOsix/Tg β), heterocigotos, no presentan ninguna alteración en su fenotipo y muestran recombinación del sustrato en las células que expresan la β -rec, confirmando la potencial utilidad de este sistema para la modificación condicional del genoma murino y posiblemente de otros animales de experimentación.

Ya en 1998 en el congreso "Conditional Genome Alterations" se lanzó un mensaje a la comunidad científica: "Cre funciona" (Rossant and McMahon, 1999). Y desde entonces su grandísimo desarrollo la ha convertido en una herramienta indispensable en la manipulación génica condicional en ratón: La afirmación ha pasado sin duda a ser "to Cre or not to Cre".

Pero Cre también presenta en ocasiones inconvenientes graves asociados a una alta expresión o a una actividad prolongada. Esto hace difícil la planificación y consecución de esquemas experimentales más elaborados (Meyers et al., 1998). Sin embargo, como cada vez es más necesario poder realizar manipulaciones complejas del genoma, se impone realizar modificaciones en los sistemas de RES ya existentes, así como poder disponer de otros que otorguen una mayor especificidad al proceso y permitan el estudio de eventos relacionados o secuenciales.

La clave para el futuro será tener un abanico de recombinasas con propiedades diferentes y complementarias de modo que no haya que conformarse con una, sino que pueda emplearse la más adecuada a cada experimento concreto, y se puedan combinar de forma eficaz dos o más de ellas en la generación de estas nuevas modificaciones más complejas.

En este sentido, éste y otros trabajos han demostrado sin duda la utilidad de la β recombinasa como herramienta para la manipulación condicional del genoma. Por eso nosotros proponemos un nuevo mensaje:

"to Cre or more than Cre"

Signed by β

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, J.L., Serrano, F., San Roman, A.L., Delgado, R., Bernad, A., and Gonzalez, M.A. (2002). Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells. *J Gene Med* 4, 27-37.
- Abe, T., and Fujimori, T. (2013). Reporter mouse lines for fluorescence imaging. *Dev Growth Differ* 55, 390-405.
- Abremski, K., and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of biological chemistry* 259, 1509-1514.
- Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32, 1301-1311.
- Agah, R., Frenkel, P.A., French, B.A., Michael, L.H., Overbeek, P.A., and Schneider, M.D. (1997). Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest* 100, 169-179.
- Ahmed, B.Y., Chakravarthy, S., Eggers, R., Hermens, W.T., Zhang, J.Y., Niclou, S.P., Levelt, C., Sablitzky, F., Anderson, P.N., Lieberman, A.R., *et al.* (2004). Efficient delivery of Cre-recombinase to neurons in vivo and stable transduction of neurons using adeno-associated and lentiviral vectors. *BMC Neurosci* 5, 4.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic acids research* 25, 1766-1773.
- Allen, J.M., Forbush, K.A., and Perlmutter, R.M. (1992). Functional dissection of the lck proximal promoter. *Mol Cell Biol* 12, 2758-2768.
- Alonso, J.C., Ayora, S., Canosa, I., Weise, F., and Rojo, F. (1996). Site-specific recombination in gram-positive theta-replicating plasmids. *FEMS Microbiol Lett* 142, 1-10.
- Alonso, J.C., Gutierrez, C., and Rojo, F. (1995a). The role of chromatin-associated protein Hbsu in beta-mediated DNA recombination is to facilitate the joining of distant recombination sites. *Mol Microbiol* 18, 471-478.
- Alonso, J.C., Weise, F., and Rojo, F. (1995b). The *Bacillus subtilis* histone-like protein Hbsu is required for DNA resolution and DNA inversion mediated by the beta recombinase of plasmid pSM19035. *The Journal of biological chemistry* 270, 2938-2945.
- Anastassiadis, K., Fu, J., Patsch, C., Hu, S., Weidlich, S., Duerschke, K., Buchholz, F., Edenhofer, F., and Stewart, A.F. (2009). Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Disease models & mechanisms* 2, 508-515.
- Anderson, G., and Takahama, Y. (2012). Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* 33, 256-263.
- Anderson, R.P., Voziyanova, E., and Voziyanov, Y. (2012). Flp and Cre expressed from Flp-2A-Cre and Flp-IRES-Cre transcription units mediate the highest level of dual recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic acids research* 40, e62.
- Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N., and Kuhn, R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic acids research* 30, 2299-2306.
- Angrand, P.O., Woodroffe, C.P., Buchholz, F., and Stewart, A.F. (1998). Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic acids research* 26, 3263-3269.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J., and Vassalli, P. (1995). Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 160-164.

- Araki, K., Araki, M., and Yamamura, K. (1997). Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic acids research* 25, 868-872.
- Araki, K., Okada, Y., Araki, M., and Yamamura, K. (2010). Comparative analysis of right element mutant lox sites on recombination efficiency in embryonic stem cells. *BMC Biotechnol* 10, 29.
- Aranda, M., Kanellopoulou, C., Christ, N., Peitz, M., Rajewsky, K., and Droge, P. (2001). Altered directionality in the Cre-LoxP site-specific recombination pathway. *Journal of molecular biology* 311, 453-459.
- Arbour, N.C., Prahl, J.M., and DeLuca, H.F. (1993). Stabilization of the vitamin D receptor in rat osteosarcoma cells through the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* 7, 1307-1312.
- Arnold, P.H., Blake, D.G., Grindley, N.D., Boocock, M.R., and Stark, W.M. (1999). Mutants of Tn3 resolvase which do not require accessory binding sites for recombination activity. *Embo J* 18, 1407-1414.
- Austin, C.P., Battey, J.F., Bradley, A., Bucan, M., Capecchi, M., Collins, F.S., Dove, W.F., Duyk, G., Dymecki, S., Eppig, J.T., et al. (2004). The knockout mouse project. *Nature genetics* 36, 921-924.
- Awatramani, R., Soriano, P., Mai, J.J., and Dymecki, S. (2001). An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus. *Nature genetics* 29, 257-259.
- Awatramani, R., Soriano, P., Rodriguez, C., Mai, J.J., and Dymecki, S.M. (2003). Cryptic boundaries in roof plate and choroid plexus identified by intersectional gene activation. *Nature genetics* 35, 70-75.
- Baba, Y., Nakano, M., Yamada, Y., Saito, I., and Kanegae, Y. (2005). Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 49, 559-570.
- Belizario, J.E., Akamini, P., Wolf, P., Strauss, B., and Xavier-Neto, J. (2012). New routes for transgenesis of the mouse. *Journal of applied genetics* 53, 295-315.
- Belteki, G., Gertsenstein, M., Ow, D.W., and Nagy, A. (2003). Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. *Nat Biotechnol* 21, 321-324.
- Bergo, M.O., Gavino, B.J., Hong, C., Beigneux, A.P., McMahon, M., Casey, P.J., and Young, S.G. (2004). Inactivation of *lcm1* inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. *J Clin Invest* 113, 539-550.
- Betz, U.A., Voshenrich, C.A., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996). Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* 6, 1307-1316.
- Bianchi, M.E. (1994). Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1: a kinked relationship. *Mol Microbiol* 14, 1-5.
- Birling, M.C., Gofflot, F., and Warot, X. (2009). Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods in molecular biology* 561, 245-263.
- Blake, J.A., Richardson, J.E., Bult, C.J., Kadin, J.A., Eppig, J.T., and Mouse Genome Database, G. (2002). The Mouse Genome Database (MGD): the model organism database for the laboratory mouse. *Nucleic acids research* 30, 113-115.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., and Zabel, B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11, 115-132.
- Bories, J.C., Demengeot, J., Davidson, L., and Alt, F.W. (1996). Gene-targeted deletion and replacement mutations of the T-cell receptor beta-chain enhancer: the role of enhancer elements in controlling V(D)J recombination accessibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7871-7876.

- Bouabe, H., Moser, M., and Heesemann, J. (2012). Enhanced selection for homologous-recombinant embryonic stem cell clones by Cre recombinase-mediated deletion of the positive selection marker. *Transgenic research* 21, 227-229.
- Bouabe, H., and Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods in molecular biology* 1064, 315-336.
- Bouvier, G., Watrin, F., Naspetti, M., Verthuy, C., Naquet, P., and Ferrier, P. (1996). Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7877-7881.
- Bradley, A., Anastassiadis, K., Ayadi, A., Battey, J.F., Bell, C., Birling, M.C., Bottomley, J., Brown, S.D., Burger, A., Bult, C.J., *et al.* (2012). The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mamm Genome* 23, 580-586.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
- Branda, C.S., and Dymecki, S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6, 7-28.
- Brocard, J., Feil, R., Chambon, P., and Metzger, D. (1998). A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic acids research* 26, 4086-4090.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14559-14563.
- Bruand, C., Ehrlich, S.D., and Janniere, L. (1991). Unidirectional theta replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. *Embo J* 10, 2171-2177.
- Buchholz, F., Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16, 657-662.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.O., Rossi, F., and Stewart, A.F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic acids research* 24, 4256-4262.
- Buchholz, F., and Stewart, A.F. (2001). Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution. *Nat Biotechnol* 19, 1047-1052.
- Buckland, J., Pennington, D.J., Bruno, L., and Owen, M.J. (2000). Co-ordination of the expression of the protein tyrosine kinase p56(lck) with the pre-T cell receptor during thymocyte development. *European journal of immunology* 30, 8-18.
- Bustin, M., and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54, 35-100.
- Buttayan, R., Olsson, C.A., Sheard, B., and Kallos, J. (1983). Steroid receptor-nuclear matrix interactions. The role of DNA. *The Journal of biological chemistry* 258, 14366-14370.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., and Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature genetics* 22, 276-280.
- Calos, M.P. (2006). The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 633-645.
- Canosa, I., Lopez, G., Rojo, F., Boocock, M.R., and Alonso, J.C. (2003). Synapsis and strand exchange in the resolution and DNA inversion reactions catalysed by the beta recombinase. *Nucleic acids research* 31, 1038-1044.
- Canosa, I., Lurz, R., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1998). beta Recombinase catalyzes inversion and resolution between two inversely oriented six sites on a supercoiled DNA substrate and

only inversion on relaxed or linear substrates. *The Journal of biological chemistry* 273, 13886-13891.

Canosa, I., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1996). Site-specific recombination by the beta protein from the streptococcal plasmid pSM19035: minimal recombination sequences and crossing over site. *Nucleic acids research* 24, 2712-2717.

Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.

Capecchi, M.R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6, 507-512.

Casanova, E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D.R., Sprengel, R., and Mantamadiotis, T. (2002). ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis* 34, 208-214.

Casanova, E., Lemberger, T., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., and Schutz, G. (2003). Alpha complementation in the Cre recombinase enzyme. *Genesis* 37, 25-29.

Ceglowski, P., Boitsov, A., Chai, S., and Alonso, J.C. (1993a). Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene* 136, 1-12.

Ceglowski, P., Boitsov, A., Karamyan, N., Chai, S., and Alonso, J.C. (1993b). Characterization of the effectors required for stable inheritance of *Streptococcus pyogenes* pSM19035-derived plasmids in *Bacillus subtilis*. *Molecular & general genetics : MGG* 241, 579-585.

Ceglowski, P., Lurz, R., and Alonso, J.C. (1993c). Functional analysis of pSM19035-derived replicons in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 109, 145-150.

Ceredig, R., and Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2, 888-897.

Chalberg, T.W., Portlock, J.L., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., Kirby, P.J., Hillman, R.T., Hoelters, J., and Calos, M.P. (2006). Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *Journal of molecular biology* 357, 28-48.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10, 940-954.

Cheah, S.S., and Behringer, R.R. (2001). Contemporary gene targeting strategies for the novice. *Mol Biotechnol* 19, 297-304.

Chen, Y.T., and Bradley, A. (2000). A new positive/negative selectable marker, puDeltatk, for use in embryonic stem cells. *Genesis* 28, 31-35.

Cheng, T.H., Chang, C.R., Joy, P., Yablok, S., and Gartenberg, M.R. (2000). Controlling gene expression in yeast by inducible site-specific recombination. *Nucleic acids research* 28, E108.

Chiba, H., Chambon, P., and Metzger, D. (2000). F9 embryonal carcinoma cells engineered for tamoxifen-dependent Cre-mediated site-directed mutagenesis and doxycycline-inducible gene expression. *Exp Cell Res* 260, 334-339.

Chien, K.R. (2001). To Cre or not to Cre: the next generation of mouse models of human cardiac diseases. *Circulation research* 88, 546-549.

Chilton, J.M., and Le Doux, J.M. (2008). Quantitative analysis of retroviral and lentiviral gene transfer to murine embryonic stem cells. *J Biotechnol* 138, 42-51.

Choi, T., Huang, M., Gorman, C., and Jaenisch, R. (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 11, 3070-3074.

Chow, L.M., Tian, Y., Weber, T., Corbett, M., Zuo, J., and Baker, S.J. (2006). Inducible Cre recombinase activity in mouse cerebellar granule cell precursors and inner ear hair cells.

Dev Dyn 235, 2991-2998.

Christ, N., Corona, T., and Droge, P. (2002). Site-specific recombination in eukaryotic cells mediated by mutant lambda integrases: implications for synaptic complex formation and the reactivity of episomal DNA segments. *Journal of molecular biology* 319, 305-314.

Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic acids research* 15, 1311-1326.

Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., *et al.* (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406, 415-418.

Clark, A.J., Bissinger, P., Bullock, D.W., Damak, S., Wallace, R., Whitelaw, C.B., and Yull, F. (1994). Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. *Reprod Fertil Dev* 6, 589-598.

Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Beyond 'knock-out' mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol Hum Reprod* 4, 929-938.

Contag, C.H., Spilman, S.D., Contag, P.R., Oshiro, M., Eames, B., Dennerly, P., Stevenson, D.K., and Benaron, D.A. (1997). Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochemistry and photobiology* 66, 523-531.

Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Court, D.L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2, 769-779.

Coppoolse, E.R., de Vroomen, M.J., Roelofs, D., Smit, J., van Gennip, F., Hersmus, B.J., Nijkamp, H.J., and van Haaren, M.J. (2003). Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants. *Plant molecular biology* 51, 263-279.

Cox, M.M. (1983). The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4223-4227.

Cui, Y., Huang, L., Eleftheriou, F., Yang, G., Shelton, J.M., Giles, J.E., Oz, O.K., Pourbahrami, T., Lu, C.Y., Richardson, J.A., *et al.* (2004). Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 24, 258-269.

Dace, A., Zhao, L., Park, K.S., Furuno, T., Takamura, N., Nakanishi, M., West, B.L., Hanover, J.A., and Cheng, S. (2000). Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8985-8990.

Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T., and Karsenty, G. (2002). Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 224, 245-251.

Dafnis-Calas, F., Xu, Z., Haines, S., Malla, S.K., Smith, M.C., and Brown, W.R. (2005). Iterative in vivo assembly of large and complex transgenes by combining the activities of phiC31 integrase and Cre recombinase. *Nucleic acids research* 33, e189.

Damkier, H.H., Prasad, V., Hubner, C.A., and Praetorius, J. (2009). Nhe1 is a luminal Na⁺/H⁺ exchanger in mouse choroid plexus and is targeted to the basolateral membrane in Ncbe/Nbcn2-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1291-1300.

Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 8, 1323-1326.

Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., and Yamamoto, K.R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12, 3343-3356.

Delaney, C.L., Brenner, M., and Messing, A. (1996). Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J Neurosci* 16, 6908-6918.

- DeMayo, F.J., and Tsai, S.Y. (2001). Targeted gene regulation and gene ablation. *Trends Endocrinol Metab* 12, 348-353.
- Deng, C.X. (2014). Conditional knockout mouse models of cancer. *Cold Spring Harbor protocols* 2014, 1217-1233.
- Dias, J.M., Go, N.F., Hart, C.P., and Mattheakis, L.C. (1998). Genetic recombination as a reporter for screening steroid receptor agonists and antagonists. *Analytical biochemistry* 258, 96-102.
- Diaz, V. (2000). La recombinasa beta del plasmido pSM19035 como herramienta para la manipulacion de genomas eucariotas. In *Dept Inmunologia y oncologia* (CNB, UAM: Madrid).
- Diaz, V., Rojo, F., Martinez, A.C., Alonso, J.C., and Bernad, A. (1999). The prokaryotic beta-recombinase catalyzes site-specific recombination in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 6634-6640.
- Diaz, V., Servert, P., Prieto, I., Gonzalez, M.A., Martinez, A.C., Alonso, J.C., and Bernad, A. (2001). New insights into host factor requirements for prokaryotic beta-recombinase-mediated reactions in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 16257-16264.
- Diebold, R.J., Eis, M.J., Yin, M., Ormsby, I., Boivin, G.P., Darrow, B.J., Saffitz, J.E., and Doetschman, T. (1995). Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12215-12219.
- Dixon, J.E., Shaikh, A.C., and Sadowski, P.D. (1995). The Fip recombinase cleaves Holliday junctions in trans. *Mol Microbiol* 18, 449-458.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., and Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* 13, 127-130.
- Doerfler, W., Schubbert, R., Heller, H., Kammer, C., Hilger-Eversheim, K., Knoblauch, M., and Remus, R. (1997). Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends Biotechnol* 15, 297-301.
- Doetschman, T., Gossler, A., Serfling, E., Schaffner, W., Marcu, K., Stanton, L., and Kemler, R. (1986). Introduction of genes into mouse embryonic stem cells. *Prog Clin Biol Res* 217A, 47-50.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-578.
- Drago, J., Padungchaichot, P., Wong, J.Y., Lawrence, A.J., McManus, J.F., Sumarsono, S.H., Natoli, A.L., Lakso, M., Wreford, N., Westphal, H., *et al.* (1998). Targeted expression of a toxin gene to D1 dopamine receptor neurons by cre-mediated site-specific recombination. *J Neurosci* 18, 9845-9857.
- Droge, P., Hatfull, G.F., Grindley, N.D., and Cozzarelli, N.R. (1990). The two functional domains of gamma delta resolvase act on the same recombination site: implications for the mechanism of strand exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5336-5340.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., and Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Dymecki, S.M. (1996). Fip recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6191-6196.
- Dymecki, S.M., Rodriguez, C.I., and Awatramani, R.B. (2002). Switching on lineage tracers using site-specific recombination. *Methods in molecular biology* 185, 309-334.
- Dymecki, S.M., and Tomasiewicz, H. (1998). Using Fip-recombinase to characterize expansion

- of Wnt1-expressing neural progenitors in the mouse. *Developmental biology* 201, 57-65.
- Eaton, M.J., Herman, J.P., Jullien, N., Lopez, T.L., Martinez, M., and Huang, J. (2002). Immortalized chromaffin cells disimmortalized with Cre/lox site-directed recombination for use in cell therapy for pain after partial nerve injury. *Exp Neurol* 175, 49-60.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A., Richardson, J.E., and Mouse Genome Database, G. (2012). The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic acids research* 40, D881-886.
- Esposito, D., and Scocca, J.J. (1997). The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic acids research* 25, 3605-3614.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Farley, F.W., Soriano, P., Steffen, L.S., and Dymecki, S.M. (2000). Widespread recombinase expression using FLP_{eR} (flipper) mice. *Genesis* 28, 106-110.
- Feil, R. (2007). Conditional somatic mutagenesis in the mouse using site-specific recombinases. *Handbook of experimental pharmacology*, 3-28.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10887-10890.
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods in molecular biology* 530, 343-363.
- Fejes-Toth, G., Pearce, D., and Naray-Fejes-Toth, A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2973-2978.
- Fernandez, S., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1997). The *Bacillus subtilis* chromatin-associated protein Hbsu is involved in DNA repair and recombination. *Mol Microbiol* 23, 1169-1179.
- Ferry, G., Giganti, A., Coge, F., Bertaux, F., Thiam, K., and Boutin, J.A. (2007). Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett* 581, 3572-3578.
- Florin, L., Alter, H., Grone, H.J., Szabowski, A., Schutz, G., and Angel, P. (2004). Cre recombinase-mediated gene targeting of mesenchymal cells. *Genesis* 38, 139-144.
- Forlino, A., Porter, F.D., Lee, E.J., Westphal, H., and Marini, J.C. (1999). Use of the Cre/lox recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for osteogenesis imperfecta with an $\alpha 1(I)$ G349C substitution. Variability in phenotype in *BrltIV* mice. *The Journal of biological chemistry* 274, 37923-37931.
- Frank, A.C., Meyers, K.A., Welsh, I.C., and O'Brien, T.P. (2003). Development of an enhanced GFP-based dual-color reporter to facilitate genetic screens for the recovery of mutations in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14103-14108.
- Franz, B., and Landy, A. (1995). The Holliday junction intermediates of lambda integrative and excisive recombination respond differently to the bending proteins integration host factor and excisionase. *Embo J* 14, 397-406.
- Friedel, R.H., Seisenberger, C., Kaloff, C., and Wurst, W. (2007). EUCOMM--the European conditional mouse mutagenesis program. *Briefings in functional genomics & proteomics* 6, 180-185.
- Friedel, R.H., Wurst, W., Wefers, B., and Kuhn, R. (2011). Generating conditional knockout mice. *Methods in molecular biology* 693, 205-231.
- Fuhrmann-Benzakein, E., Garcia-Gabay, I., Pepper, M.S., Vassalli, J.D., and Herrera, P.L. (2000).

- Inducible and irreversible control of gene expression using a single transgene. *Nucleic acids research* 28, E99.
- Futcher, A.B. (1986). Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of theoretical biology* 119, 197-204.
- Gaj, T., Mercer, A.C., Sirk, S.J., Smith, H.L., and Barbas, C.F., 3rd (2013). A comprehensive approach to zinc-finger recombinase customization enables genomic targeting in human cells. *Nucleic acids research* 41, 3937-3946.
- Gaj, T., Sirk, S.J., and Barbas, C.F., 3rd (2014). Expanding the scope of site-specific recombinases for genetic and metabolic engineering. *Biotechnology and bioengineering* 111, 1-15.
- Gao, X., Kemper, A., and Popko, B. (1999). Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochem Res* 24, 1181-1188.
- Garcia-Otin, A.L., and Guillou, F. (2006). Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci* 11, 1108-1136.
- Garvin, A.M., Abraham, K.M., Forbush, K.A., Farr, A.G., Davison, B.L., and Perlmutter, R.M. (1990). Disruption of thymocyte development and lymphomagenesis induced by SV40 T-antigen. *Int Immunol* 2, 173-180.
- Gierut, J.J., Jacks, T.E., and Haigis, K.M. (2014). Strategies to achieve conditional gene mutation in mice. *Cold Spring Harbor protocols* 2014, 339-349.
- Gordon, J.W., and Ruddle, F.H. (1985). DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow—a review. *Gene* 33, 121-136.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., and Bujard, H. (2002). Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36, 153-173.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grainge, I., and Jayaram, M. (1999). The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Mol Microbiol* 33, 449-456.
- Grasser, K.D., Ritt, C., Krieg, M., Fernandez, S., Alonso, J.C., and Grimm, R. (1997). The recombinant product of the *Chrytomonas phi* plastid gene *hlpA* is an architectural HU-like protein that promotes the assembly of complex nucleoprotein structures. *European journal of biochemistry / FEBS* 249, 70-76.
- Grindley, N.D., Lauth, M.R., Wells, R.G., Wityk, R.J., Salvo, J.J., and Reed, R.R. (1982). Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the *res* sites of gamma delta and Tn3. *Cell* 30, 19-27.
- Gronlund, J.T., Stemmer, C., Lichota, J., Merkle, T., and Grasser, K.D. (2007). Functionality of the beta/six site-specific recombination system in tobacco and *Arabidopsis*: a novel tool for genetic engineering of plant genomes. *Plant molecular biology* 63, 545-556.
- Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., and Calos, M.P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5995-6000.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *Embo J* 10, 3851-3859.

- Guo, C., Yang, W., and Lobe, C.G. (2002). A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis* 32, 8-18.
- Hager, G.L., Elbi, C., and Becker, M. (2002). Protein dynamics in the nuclear compartment. *Curr Opin Genet Dev* 12, 137-141.
- Hall, B., Limaye, A., and Kulkarni, A.B. (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 19, Unit 19 12 19 12 11-17.*
- Hallet, B., and Sherratt, D.J. (1997). Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol Rev* 21, 157-178.
- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A.B., and Joyner, A.L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269, 679-682.
- Hao, Z.M., Yang, X., Cheng, X., Zhou, J., and Huang, C.F. (2002). [Generation and characterization of chondrocyte specific Cre transgenic mice]. *Yi Chuan Xue Bao* 29, 424-429.
- Hardy, S., Legagneux, V., Audic, Y., and Paillard, L. (2010). Reverse genetics in eukaryotes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 102, 561-580.
- Harris, S. (2001). Transgenic knockouts as part of high-throughput, evidence-based target selection and validation strategies. *Drug Discov Today* 6, 628-636.
- Hartmann, T., Dumig, M., Jaber, B.M., Szewczyk, E., Olbermann, P., Morschhauser, J., and Krappmann, S. (2010). Validation of a self-excising marker in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* by employing the beta-rec/six site-specific recombination system. *Appl Environ Microbiol* 76, 6313-6317.
- Hartung, M., and Kisters-Woike, B. (1998). Cre mutants with altered DNA binding properties. *The Journal of biological chemistry* 273, 22884-22891.
- Hasan, M.T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W., and Bujard, H. (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* 29, 116-122.
- Hasty, P., Abuin, A., and Bradley, A. (2000). Gene targeting, principles, and practice in mammalian cells. *Gene Targeting: A practical Approach* (2nd ed) Oxford University Press *chapt. 1*, 1-35.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11, 5586-5591.
- Hayashi, S., and McMahon, A.P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology* 244, 305-318.
- He, B., Bowen, N.T., Minges, J.T., and Wilson, E.M. (2001). Androgen-induced NH2- and COOH-terminal Interaction Inhibits p160 coactivator recruitment by activation function 2. *The Journal of biological chemistry* 276, 42293-42301.
- He, B., Kemppainen, J.A., and Wilson, E.M. (2000). FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 22986-22994.
- He, L., Marioutina, M., Dunaief, J.L., and Marneros, A.G. (2014). Age- and gene-dosage-dependent cre-induced abnormalities in the retinal pigment epithelium. *The American journal of pathology* 184, 1660-1667.
- Heitz, F., Johansson, T., Baumgartel, K., Gecaj, R., Pelczar, P., and Mansuy, I.M. (2014). Heritable and inducible gene knockdown in astrocytes or neurons in vivo by a combined lentiviral and RNAi approach. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 62.

- Higashi, A.Y., Ikawa, T., Muramatsu, M., Economides, A.N., Niwa, A., Okuda, T., Murphy, A.J., Rojas, J., Heike, T., Nakahata, T., *et al.* (2009). Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *Journal of immunology* 182, 5633-5640.
- Hoa, T.T., Bong, B.B., Huq, E., and Hodges, T.K. (2002). Cre/ lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 104, 518-525.
- Hollis, R.P., Stoll, S.M., Scimienti, C.R., Lin, J., Chen-Tsai, Y., and Calos, M.P. (2003). Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 79.
- Hunter, N.L., Awatramani, R.B., Farley, F.W., and Dymecki, S.M. (2005). Ligand-activated Flpe for temporally regulated gene modifications. *Genesis* 41, 99-109.
- Husmann, D.A., Wilson, C.M., McPhaul, M.J., Tilley, W.D., and Wilson, J.D. (1990). Antipeptide antibodies to two distinct regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the nuclei of target cells in the rat and human prostate. *Endocrinology* 126, 2359-2368.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P., and Metzger, D. (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 224-228.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research* 27, 4324-4327.
- International Mouse Knockout, C., Collins, F.S., Rossant, J., and Wurst, W. (2007). A mouse for all reasons. *Cell* 128, 9-13.
- Jackson, E.L., Olive, K.P., Tuveson, D.A., Bronson, R., Crowley, D., Brown, M., and Jacks, T. (2005). The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer research* 65, 10280-10288.
- Jaenisch, R., and Mintz, B. (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 1250-1254.
- Jaisser, F. (2000). Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16, S95-S100.
- Janbandhu, V.C., Moik, D., and Fassler, R. (2014). Cre recombinase induces DNA damage and tetraploidy in the absence of loxP sites. *Cell Cycle* 13, 462-470.
- Jenster, G., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *The Biochemical journal* 293 (Pt 3), 761-768.
- Jin, C., McKeenan, K., and Wang, F. (2003). Transgenic mouse with high Cre recombinase activity in all prostate lobes, seminal vesicle, and ductus deferens. *Prostate* 57, 160-164.
- Jo, D., Nashabi, A., Dohsee, C., Lin, Q., Unutmaz, D., Chen, J., and Ruley, H.E. (2001). Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nat Biotechnol* 19, 929-933.
- Johnson, R.C., and Bruist, M.F. (1989). Intermediates in Hin-mediated DNA inversion: a role for Fis and the recombinational enhancer in the strand exchange reaction. *Embo J* 8, 1581-1590.
- Jones, J.R., Shelton, K.D., and Magnuson, M.A. (2005). Strategies for the use of site-specific recombinases in genome engineering. *Methods Mol Med* 103, 245-257.
- Joshi, S.K., Hashimoto, K., and Koni, P.A. (2002). Induced DNA recombination by Cre recombinase protein transduction. *Genesis* 33, 48-54.

- Kaartinen, V., and Nagy, A. (2001). Removal of the floxed neo gene from a conditional knockout allele by the adenoviral Cre recombinase in vivo. *Genesis* 31, 126-129.
- Kaczmarczyk, S.J., and Green, J.E. (2001). A single vector containing modified cre recombinase and LOX recombination sequences for inducible tissue-specific amplification of gene expression. *Nucleic acids research* 29, E56-56.
- Kaczmarczyk, S.J., and Green, J.E. (2003). Induction of cre recombinase activity using modified androgen receptor ligand binding domains: a sensitive assay for ligand-receptor interactions. *Nucleic acids research* 31, e86.
- Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S., and Saito, I. (1995). Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic acids research* 23, 3816-3821.
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.
- Kawamoto, S., Niwa, H., Tashiro, F., Sano, S., Kondoh, G., Takeda, J., Tabayashi, K., and Miyazaki, J. (2000). A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett* 470, 263-268.
- Kawata, M. (1995). Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 24, 1-46.
- Kawata, M. (2001). Subcellular steroid/nuclear receptor dynamics. *Arch Histol Cytol* 64, 353-368.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opher, C., and Schutz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *Journal of molecular biology* 285, 175-182.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., and Schutz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic acids research* 24, 1404-1411.
- Kemppainen, J.A., Lane, M.V., Sar, M., and Wilson, E.M. (1992). Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *The Journal of biological chemistry* 267, 968-974.
- Kemppainen, J.A., Langley, E., Wong, C.I., Bobseine, K., Kelce, W.R., and Wilson, E.M. (1999). Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct mechanisms of activation by medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone. *Mol Endocrinol* 13, 440-454.
- King, W.J., and Greene, G.L. (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307, 745-747.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jeretic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10933-10938.
- Klippel, A., Cloppenborg, K., and Kahmann, R. (1988). Isolation and characterization of unusual gin mutants. *Embo J* 7, 3983-3989.
- Koch, W.J., Rockman, H.A., Samama, P., Hamilton, R.A., Bond, R.A., Milano, C.A., and Lefkowitz, R.J. (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 268, 1350-1353.
- Kolb, A.F. (2001). Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 [correction of lox2722] site. *Analytical biochemistry* 290, 260-271.
- Kolb, A.F. (2002). Genome engineering using site-specific recombinases. *Cloning Stem Cells* 4, 65-80.
- Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Okabe, M., and Shirakura, R.

- (2000). A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in mammals: a powerful material for organ-specific gene targeting. *Transplant Proc* 32, 2516-2517.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *Embo J* 16, 2482-2492.
- Kretzschmar, K., and Watt, F.M. (2012). Lineage tracing. *Cell* 148, 33-45.
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* 28, 15-22.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Kwak, I., Tsai, S.Y., and DeMayo, F.J. (2004). Genetically engineered mouse models for lung cancer. *Annu Rev Physiol* 66, 647-663.
- Kwan, K.M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32, 49-62.
- Labow, M.A., Baim, S.B., Shenk, T., and Levine, A.J. (1990). Conversion of the lac repressor into an allosterically regulated transcriptional activator for mammalian cells. *Mol Cell Biol* 10, 3343-3356.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6232-6236.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58, 913-949.
- Langer, S.J., Ghafoori, A.P., Byrd, M., and Leinwand, L. (2002). A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites. *Nucleic acids research* 30, 3067-3077.
- Langley, E., Zhou, Z.X., and Wilson, E.M. (1995). Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *The Journal of biological chemistry* 270, 29983-29990.
- Lauth, M., Spreafico, F., Dethleffsen, K., and Meyer, M. (2002). Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic acids research* 30, e115.
- Lee, G., and Saito, I. (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216, 55-65.
- Lee, K.C., and Lee Kraus, W. (2001). Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights. *Trends Endocrinol Metab* 12, 191-197.
- Leneuve, P., Colnot, S., Hamard, G., Francis, F., Niwa-Kawakita, M., Giovannini, M., and Holzenberger, M. (2003). Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic acids research* 31, e21.
- Lerner, A., D'Adamio, L., Diener, A.C., Clayton, L.K., and Reinherz, E.L. (1993). CD3 zeta/eta/theta locus is colinear with and transcribed antisense to the gene encoding the transcription factor Oct-1. *Journal of immunology* 151, 3152-3162.
- Leschziner, A.E., Boocock, M.R., and Grindley, N.D. (1995). The tyrosine-6 hydroxyl of gamma

- delta resolvase is not required for the DNA cleavage and rejoining reactions. *Mol Microbiol* 15, 865-870.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-755.
- Li, M., Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., and Chambon, P. (2000). Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis. *Nature* 407, 633-636.
- Li, Q., Haigis, K.M., McDaniel, A., Harding-Theobald, E., Kogan, S.C., Akagi, K., Wong, J.C., Braun, B.S., Wolff, L., Jacks, T., *et al.* (2011). Hematopoiesis and leukemogenesis in mice expressing oncogenic NrasG12D from the endogenous locus. *Blood* 117, 2022-2032.
- Limaye, A., Hall, B., and Kulkarni, A.B. (2009). Manipulation of mouse embryonic stem cells for knockout mouse production. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 19, Unit 19 13 19 13 11-24.*
- Lizen, B., Claus, M., Jeannotte, L., Rijli, F.M., and Gofflot, F. (2015). Perinatal induction of Cre recombination with tamoxifen. *Transgenic research.*
- Lo Cascio, L., Liu, K., Nakamura, H., Chu, G., Lim, N.H., Chanalaris, A., Saklatvala, J., Nagase, H., and Bou-Gharios, G. (2014). Generation of a mouse line harboring a Bi-transgene expressing luciferase and tamoxifen-activatable creER(T2) recombinase in cartilage. *Genesis* 52, 110-119.
- Logie, C., and Stewart, A.F. (1995). Ligand-regulated site-specific recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5940-5944.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9209-9214.
- Lurquin, P.F. (1997). Gene transfer by electroporation. *Mol Biotechnol* 7, 5-35.
- Lyznik, L.A., Gordon-Kamm, W.J., and Tao, Y. (2003). Site-specific recombination for genetic engineering in plants. *Plant cell reports* 21, 925-932.
- Ma, Y., Ma, J., Zhang, X., Chen, W., Yu, L., Lu, Y., Bai, L., Shen, B., Huang, X., and Zhang, L. (2014). Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9. *The FEBS journal* 281, 3779-3790.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunken, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., *et al.* (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13, 133-140.
- Maetzig, T., Kuehle, J., Schwarzer, A., Turan, S., Rothe, M., Chaturvedi, A., Morgan, M., Ha, T.C., Heuser, M., Hammerschmidt, W., *et al.* (2014). All-in-One inducible lentiviral vector systems based on drug controlled FLP recombinase. *Biomaterials* 35, 4345-4356.
- Mansour, S.L. (1990). Gene targeting in murine embryonic stem cells: introduction of specific alterations into the mammalian genome. *Genet Anal Tech Appl* 7, 219-227.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H., and Orkin, S.H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97, 324-326.
- Mao, X., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5037-5042.

- Martin, M.C., Alonso, J.C., Suarez, J.E., and Alvarez, M.A. (2000). Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl Environ Microbiol* 66, 2599-2604.
- Mathieu, N., Hempel, W.M., Spicuglia, S., Verthuy, C., and Ferrier, P. (2000). Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med* 192, 625-636.
- Matsuda, I., and Aiba, A. (2004). Receptor knock-out and knock-in strategies. *Methods in molecular biology* 259, 379-390.
- Matsuda, K., Ochiai, I., Nishi, M., and Kawata, M. (2002). Colocalization and ligand-dependent discrete distribution of the estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta. *Mol Endocrinol* 16, 2215-2230.
- Matsumoto, A.M. (1994). Hormonal therapy of male hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23, 857-875.
- Mattison, J., van der Weyden, L., Hubbard, T., and Adams, D.J. (2009). Cancer gene discovery in mouse and man. *Biochimica et biophysica acta* 1796, 140-161.
- McCulloch, R., Coggins, L.W., Colloms, S.D., and Sherratt, D.J. (1994). Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions in vivo. *Embo J* 13, 1844-1855.
- Meissner, T.B., Mandal, P.K., Ferreira, L.M., Rossi, D.J., and Cowan, C.A. (2014). Genome editing for human gene therapy. *Methods Enzymol* 546, 273-295.
- Mercer, A.C., Gaj, T., Fuller, R.P., and Barbas, C.F., 3rd (2012). Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity. *Nucleic acids research* 40, 11163-11172.
- Metivier, R., Penot, G., Flouriot, G., and Pakdel, F. (2001). Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15, 1953-1970.
- Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71-80.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6991-6995.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10, 470-476.
- Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature genetics* 18, 136-141.
- Minamino, T., Gaussin, V., DeMayo, F.J., and Schneider, M.D. (2001). Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein. *Circulation research* 88, 587-592.
- Misra, R.P., and Duncan, S.A. (2002). Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine* 19, 229-238.
- Molinari, E., Gilman, M., and Natesan, S. (1999). Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *Embo J* 18, 6439-6447.
- Moon, A.M., Boulet, A.M., and Capecchi, M.R. (2000). Normal limb development in conditional mutants of *Fgf4*. *Development* 127, 989-996.
- Moser, S., Rimann, M., Fux, C., Schlatter, S., Bailey, J.E., and Fussenegger, M. (2001). Dual-regulated expression technology: a new era in the adjustment of heterologous gene expression in mammalian cells. *J Gene Med* 3, 529-549.

- Muller, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82, 3-21.
- Mullins, J.J., and Mullins, L.J. (1993). Transgenesis in nonmurine species. *Hypertension* 22, 630-633.
- Murphy, D., and Carter, D.A. (1993). transgenesis techniques: principals and protocols. *Methods in molecular biology* 18.
- Mymryk, J.S., Fryer, C.J., Jung, L.A., and Archer, T.K. (1997). Analysis of chromatin structure in vivo. *Methods* 12, 105-114.
- Naghavi, M.H., Nowak, P., Andersson, J., Sonnerborg, A., Yang, H., Tracey, K.J., and Vahlne, A. (2003). Intracellular high mobility group B1 protein (HMGB1) represses HIV-1 LTR-directed transcription in a promoter- and cell-specific manner. *Virology* 314, 179-189.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109.
- Nagy, A., Mar, L., and Watts, G. (2009). Creation and use of a cre recombinase transgenic database. *Methods in molecular biology* 530, 365-378.
- Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A.K., Pirity, M., and Rossant, J. (1998). Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol* 8, 661-664.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8424-8428.
- Nakano, M., Odaka, K., Ishimura, M., Kondo, S., Tachikawa, N., Chiba, J., Kanegae, Y., and Saito, I. (2001). Efficient gene activation in cultured mammalian cells mediated by FLP recombinase-expressing recombinant adenovirus. *Nucleic acids research* 29, E40.
- Nandy, S., Zhao, S., Pathak, B.P., Manoharan, M., and Srivastava, V. (2015). Gene stacking in plant cell using recombinases for gene integration and nucleases for marker gene deletion. *BMC Biotechnol* 15, 93.
- Nanto, K., and Ebinuma, H. (2008). Marker-free site-specific integration plants. *Transgenic research* 17, 337-344.
- Nash, H.A. (1996). Site-specific recombination: integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segments. *American Society for Microbiology, Washington, DC* 2, 2363-2376.
- Nash, H.A., and Pollock, T.J. (1983). Site-specific recombination of bacteriophage lambda. The change in topological linking number associated with exchange of DNA strands. *Journal of molecular biology* 170, 19-38.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70, 5701-5705.
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimazaki, S., and Ota, M. (1994). Dimerization characteristics of the DNA- and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50, 225-233.
- Nichols, M., Rientjes, J.M., Logie, C., and Stewart, A.F. (1997). FLP recombinase/estrogen receptor fusion proteins require the receptor D domain for responsiveness to antagonists, but not agonists. *Mol Endocrinol* 11, 950-961.
- Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J.W., Herrmann, D., Lemme, E., and Paul, D. (1999). Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic research* 8, 237-247.
- Nishi, M., Ogawa, H., Ito, T., Matsuda, K.I., and Kawata, M. (2001). Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral

variants. *Mol Endocrinol* 15, 1077-1092.

No, D., Yao, T.P., and Evans, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3346-3351.

Nomura, W., Masuda, A., Ohba, K., Urabe, A., Ito, N., Ryo, A., Yamamoto, N., and Tamamura, H. (2012). Effects of DNA binding of the zinc finger and linkers for domain fusion on the catalytic activity of sequence-specific chimeric recombinases determined by a facile fluorescent system. *Biochemistry* 51, 1510-1517.

Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., and Lobe, C.G. (2000). Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28, 147-155.

Nunes-Duby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., and Landy, A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic acids research* 26, 391-406.

O'Gorman, S., Dagenais, N.A., Qian, M., and Marchuk, Y. (1997). Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14602-14607.

O'Gorman, S., Fox, D.T., and Wahl, G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.

Oberto, J., Drlica, K., and Rouviere-Yaniv, J. (1994). Histones, HMG, HU, IHF: Meme combat. *Biochimie* 76, 901-908.

Ochiai, I., Matsuda, K., Nishi, M., Ozawa, H., and Kawata, M. (2004). Imaging analysis of subcellular correlation of androgen receptor and estrogen receptor alpha in single living cells using green fluorescent protein color variants. *Mol Endocrinol* 18, 26-42.

Ohno, H., Goto, S., Taki, S., Shirasawa, T., Nakano, H., Miyatake, S., Aoe, T., Ishida, Y., Maeda, H., Shirai, T., *et al.* (1994). Targeted disruption of the CD3 eta locus causes high lethality in mice: modulation of Oct-1 transcription on the opposite strand. *Embo J* 13, 1157-1165.

Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6861-6865.

Orth, P., Jekow, P., Alonso, J.C., and Hinrichs, W. (1999). Proteolytic cleavage of gram-positive beta recombinase is required for crystallization. *Protein Eng* 12, 371-373.

Osterwalder, M., Galli, A., Rosen, B., Skarnes, W.C., Zeller, R., and Lopez-Rios, J. (2010). Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles. *Nat Methods* 7, 893-895.

Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4489-4494.

Peng, L.Y., Cheng, T., and Yuan, W.P. (2014). [Commonly used cre transgenic mice and their applications in hematopoietic system]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 22, 1442-1447.

Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M.T., and Milgrom, E. (1985). Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology* 116, 1473-1484.

Pfeifer, A., Brandon, E.P., Kootstra, N., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2001). Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11450-11455.

Pham, C.T., MacIvor, D.M., Hug, B.A., Heusel, J.W., and Ley, T.J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America 93, 13090-13095.
- Picard, D. (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol* 5, 511-515.
- Pirity, M., Hadjantonakis, A.K., and Nagy, A. (1998). Embryonic stem cells, creating transgenic animals. *Methods Cell Biol* 57, 279-293.
- Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., Dahlman, J.E., Parnas, O., Eisenhaure, T.M., Jovanovic, M., et al. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159, 440-455.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Santti, H., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2000). Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 275, 571-579.
- Prieto, J., Molina, R., and Montoya, G. (2012). Molecular scissors for in situ cellular repair. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47, 207-221.
- Prosser, H., and Rastan, S. (2003). Manipulation of the mouse genome: a multiple impact resource for drug discovery and development. *Trends Biotechnol* 21, 224-232.
- Psarras, S., Karagianni, N., Kellendonk, C., Tronche, F., Cosset, F.L., Stocking, C., Schirmacher, V., Boehmer Hv, H., and Khazaie, K. (2004). Gene transfer and genetic modification of embryonic stem cells by Cre- and Cre-PR-expressing MESV-based retroviral vectors. *J Gene Med* 6, 32-42.
- Pugach, E.K., Richmond, P.A., Azofeifa, J.G., Dowell, R.D., and Leinwand, L.A. (2015). Prolonged Cre expression driven by the alpha-myosin heavy chain promoter can be cardiotoxic. *J Mol Cell Cardiol* 86, 54-61.
- Racz, A., and Barsony, J. (1999). Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *The Journal of biological chemistry* 274, 19352-19360.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603.
- Rassoulzadegan, M., Magliano, M., and Cuzin, F. (2002). Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *Embo J* 21, 440-450.
- Raymond, C.S., and Soriano, P. (2007). High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PloS one* 2, e162.
- Ren, S.Y., Pasqualetti, M., Dierich, A., Le Meur, M., and Rijli, F.M. (2002). A Hoxa2 mutant conditional allele generated by Flp- and Cre-mediated recombination. *Genesis* 32, 105-108.
- Rezzani, R., Bonomini, F., and Rodella, L.F. (2008). Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 43, 73-120.
- Rice, P.A. (2005). Resolving integral questions in site-specific recombination. *Nat Struct Mol Biol* 12, 641-643.
- Rijli, F.M., Dolle, P., Fraulob, V., LeMeur, M., and Chambon, P. (1994). Insertion of a targeting construct in a Hoxd-10 allele can influence the control of Hoxd-9 expression. *Dev Dyn* 201, 366-377.
- Ringrose, L., Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1997). The Kw recombinase, an integrase from *Kluyveromyces waltii*. *European journal of biochemistry / FEBS* 248, 903-912.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R., and Stewart, A.F. (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *Journal of molecular biology* 284, 363-384.
- Ritt, C., Grimm, R., Fernandez, S., Alonso, J.C., and Grasser, K.D. (1998). Four differently chromatin-associated maize HMG domain proteins modulate DNA structure and act as architectural elements in nucleoprotein complexes. *Plant J* 14, 623-631.

- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nature genetics* 25, 139-140.
- Rogowsky, P., Halford, S.E., and Schmitt, R. (1985). Definition of three resolvase binding sites at the res loci of Tn21 and Tn1721. *Embo J* 4, 2135-2141.
- Rojo, F., and Alonso, J.C. (1994). A novel site-specific recombinase encoded by the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *Journal of molecular biology* 238, 159-172.
- Rojo, F., and Alonso, J.C. (1995). The beta recombinase of plasmid pSM19035 binds to two adjacent sites, making different contacts at each of them. *Nucleic acids research* 23, 3181-3188.
- Rojo, F., Weise, F., and Alonso, J.C. (1993). Purification of the beta product encoded by the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. A putative DNA recombinase required to resolve plasmid oligomers. *FEBS Lett* 328, 169-173.
- Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G.M., and Golic, K.G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev* 16, 1568-1581.
- Rossant, J., and McMahon, A. (1999). "Cre"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev* 13, 142-145.
- Rossant, J., and Nagy, A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1, 592-594.
- Rossant, J., and Spence, A. (1998). Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends Genet* 14, 358-363.
- Rowland, S.J., Stark, W.M., and Boocock, M.R. (2002). Sin recombinase from *Staphylococcus aureus*: synaptic complex architecture and transposon targeting. *Mol Microbiol* 44, 607-619.
- Rubtsova, M., Kempe, K., Gils, A., Ismagul, A., Weyen, J., and Gils, M. (2008). Expression of active *Streptomyces* phage phiC31 integrase in transgenic wheat plants. *Plant cell reports* 27, 1821-1831.
- Ryding, A.D., Sharp, M.G., and Mullins, J.J. (2001). Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol* 171, 1-14.
- Saam, J.R., and Gordon, J.I. (1999). Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *The Journal of biological chemistry* 274, 38071-38082.
- Saez, E., No, D., West, A., and Evans, R.M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 8, 608-616.
- Saito, Y., Yokota, T., Mitani, T., Ito, K., Anzai, M., Miyagishi, M., Taira, K., and Mizusawa, H. (2005). Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *The Journal of biological chemistry* 280, 42826-42830.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sanchez, H., Cozar, M.C., and Martinez-Jimenez, M.I. (2007). Targeting the *Bacillus subtilis* genome: an efficient and clean method for gene disruption. *J Microbiol Methods* 70, 389-394.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *Embo J* 5, 3133-3142.
- Santoro, S.W., and Schultz, P.G. (2002). Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4185-4190.
- Sar, M., Lubahn, D.B., French, F.S., and Wilson, E.M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127, 3180-3186.

- Sarkis, G.J., Murley, L.L., Leschziner, A.E., Boocock, M.R., Stark, W.M., and Grindley, N.D. (2001). A model for the gamma delta resolvase synaptic complex. *Mol Cell* 8, 623-631.
- Sato, T., Samori, Y., and Kobayashi, Y. (1990). The *cisA* cistron of *Bacillus subtilis* sporulation gene *spoIVC* encodes a protein homologous to a site-specific recombinase. *J Bacteriol* 172, 1092-1098.
- Sauer, B. (1993). Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol* 225, 890-900.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, 381-392.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5166-5170.
- Schaft, J., Ashery-Padan, R., van der Hoeven, F., Gruss, P., and Stewart, A.F. (2001). Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis* 31, 6-10.
- Schebelle, L., Wolf, C., Stribl, C., Javaheri, T., Schnutgen, F., Ettinger, A., Ivics, Z., Hansen, J., Ruiz, P., von Melchner, H., *et al.* (2010). Efficient conditional and promoter-specific in vivo expression of cDNAs of choice by taking advantage of recombinase-mediated cassette exchange using FLEX gene traps. *Nucleic acids research* 38, e106.
- Schlake, T., and Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33, 12746-12751.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., and Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13702-13707.
- Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nature immunology* 8, 665-668.
- Schnutgen, F., Doerflinger, N., Calleja, C., Wendling, O., Chambon, P., and Ghyselinck, N.B. (2003). A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nat Biotechnol* 21, 562-565.
- Schnutgen, F., Stewart, A.F., von Melchner, H., and Anastassiadis, K. (2006). Engineering embryonic stem cells with recombinase systems. *Methods Enzymol* 420, 100-136.
- Schonhuber, N., Seidler, B., Schuck, K., Veltkamp, C., Schachtler, C., Zukowska, M., Eser, S., Feyerabend, T.B., Paul, M.C., Eser, P., *et al.* (2014). A next-generation dual-recombinase system for time- and host-specific targeting of pancreatic cancer. *Nat Med* 20, 1340-1347.
- Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., and Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic acids research* 30, e134.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P.O., Rajewsky, K., and Stewart, A.F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic acids research* 26, 1427-1432.
- Schwikardi, M., and Droge, P. (2000). Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by gammadelta resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Lett* 471, 147-150.
- Segall, A.M., Goodman, S.D., and Nash, H.A. (1994). Architectural elements in nucleoprotein complexes: interchangeability of specific and non-specific DNA binding proteins. *Embo J* 13, 4536-4548.
- Seibler, J., Zevnik, B., Kuter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G., *et al.* (2003). Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic acids research* 31, e12.
- Senecoff, J.F., Rossmeissl, P.J., and Cox, M.M. (1988). DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 mu plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site. *Journal of molecular*

biology 201, 405-421.

Servert, P., Diaz, V., Lucas, D., de la Cueva, T., Rodriguez, M., Garcia-Castro, J., Alonso, J., Martinez, A.C., Gonzalez, M., and Bernad, A. (2008). In vivo site-specific recombination using the beta-rec/six system. *BioTechniques* 45, 69-78.

Shaikh, A.C., and Sadowski, P.D. (2000). Trans complementation of variant Cre proteins for defects in cleavage and synapsis. *The Journal of biological chemistry* 275, 30186-30195.

Sharma, N., Moldt, B., Dalsgaard, T., Jensen, T.G., and Mikkelsen, J.G. (2008). Regulated gene insertion by steroid-induced PhiC31 integrase. *Nucleic acids research* 36, e67.

Sheflin, L., Keegan, B., Zhang, W., and Spaulding, S.W. (2000). Inhibiting proteasomes in human HepG2 and LNCaP cells increases endogenous androgen receptor levels. *Biochemical and biophysical research communications* 276, 144-150.

Sherratt, D.J., Arciszewska, L.K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., and McCulloch, R. (1995). Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, 37-42.

Shimizu, C., Kawamoto, H., Yamashita, M., Kimura, M., Kondou, E., Kaneko, Y., Okada, S., Tokuhisa, T., Yokoyama, M., Taniguchi, M., *et al.* (2001). Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of Ick proximal promoter activity. *Int Immunol* 13, 105-117.

Shimshak, D.R., Kim, J., Hubner, M.R., Spergel, D.J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A.F., Seeburg, P.H., and Sprengel, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* 32, 19-26.

Shultz, J.L., Voziyanova, E., Konieczka, J.H., and Voziyanov, Y. (2011). A genome-wide analysis of FRT-like sequences in the human genome. *PloS one* 6, e18077.

Silver, D.P., and Livingston, D.M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* 8, 233-243.

Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S., and Wilson, E.M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *The Journal of biological chemistry* 266, 510-518.

Singh, V.K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., and Chandra, R. (2015). Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 2.

Sinnayah, P., Lindley, T.E., Staber, P.D., Davidson, B.L., Cassell, M.D., and Davisson, R.L. (2004). Targeted viral delivery of Cre recombinase induces conditional gene deletion in cardiovascular circuits of the mouse brain. *Physiol Genomics* 18, 25-32.

Siprashvili, Z., and Khavari, P.A. (2004). Lentivectors for regulated and reversible cutaneous gene delivery. *Mol Ther* 9, 93-100.

Smith, K.R. (1999). Sperm cell mediated transgenesis: a review. *Anim Biotechnol* 10, 1-13.

Smith, K.R. (2002). Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts. *J Biotechnol* 99, 1-22.

Smith, M.C., and Thorpe, H.M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* 44, 299-307.

Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., and Kucherlapati, R.S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230-234.

Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M., and Molkentin, J.D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation research* 89, 20-25.

- Sokol, D.L., and Murray, J.D. (1996). Antisense and ribozyme constructs in transgenic animals. *Transgenic research* 5, 363-371.
- Soriano, P. (1995). Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* 18, 1-18.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* 21, 70-71.
- Sorrell, D.A., and Kolb, A.F. (2005). Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnol Adv* 23, 431-469.
- Sorrell, D.A., Robinson, C.J., Smith, J.A., and Kolb, A.F. (2010). Recombinase mediated cassette exchange into genomic targets using an adenovirus vector. *Nucleic acids research* 38, e123.
- Sreenath, T.L., Cho, A., Thyagarajan, T., and Kulkarni, A.B. (2003). Odontoblast-specific expression of cre recombinase successfully deletes gene segments flanked by loxP sites in mouse teeth. *Genesis* 35, 94-99.
- Stanford, W.L., Cohn, J.B., and Cordes, S.P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2, 756-768.
- Stark, W.M., Boocock, M.R., and Sherratt, D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet* 8, 432-439.
- Stec, D.E., Davisson, R.L., Haskell, R.E., Davidson, B.L., and Sigmund, C.D. (1999). Efficient liver-specific deletion of a floxed human angiotensinogen transgene by adenoviral delivery of Cre recombinase in vivo. *The Journal of biological chemistry* 274, 21285-21290.
- Steketee, K., Berrevoets, C.A., Dubbink, H.J., Doesburg, P., Hersmus, R., Brinkmann, A.O., and Trapman, J. (2002). Amino acids 3-13 and amino acids in and flanking the 23FxxLF27 motif modulate the interaction between the N-terminal and ligand-binding domain of the androgen receptor. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 5780-5791.
- Stemmer, C., Fernandez, S., Lopez, G., Alonso, J.C., and Grasser, K.D. (2002). Plant chromosomal HMGB proteins efficiently promote the bacterial site-specific beta-mediated recombination in vitro and in vivo. *Biochemistry* 41, 7763-7770.
- Stoll, S.M., Ginsburg, D.S., and Calos, M.P. (2002). Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells. *J Bacteriol* 184, 3657-3663.
- Summers, D., Yaish, S., Archer, J., and Sherratt, D. (1985). Multimer resolution systems of ColE1 and ColK: localisation of the crossover site. *Molecular & general genetics : MGG* 201, 334-338.
- Surendranath, V., Chusainow, J., Hauber, J., Buchholz, F., and Habermann, B.H. (2010). SeLOX—a locus of recombination site search tool for the detection and directed evolution of site-specific recombination systems. *Nucleic acids research* 38, W293-298.
- Szewczyk, E., Kasuga, T., and Fan, Z. (2013). Efficient sequential repetitive gene deletions in *Neurospora crassa* employing a self-excising beta-recombinase/six cassette. *J Microbiol Methods* 92, 236-243.
- Szewczyk, E., Kasuga, T., and Fan, Z. (2014). A new variant of self-excising beta-recombinase/six cassette for repetitive gene deletion and homokaryon purification in *Neurospora crassa*. *J Microbiol Methods* 100, 17-23.
- Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002). A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* 35, 1072-1081.
- Testa, G., Zhang, Y., Vintersten, K., Benes, V., Pijnappel, W.W., Chambers, I., Smith, A.J., Smith, A.G., and Stewart, A.F. (2003). Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles. *Nat Biotechnol* 21, 443-447.
- Tetel, M.J., Giangrande, P.H., Leonhardt, S.A., McDonnell, D.P., and Edwards, D.P. (1999). Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of

progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13, 910-924.

Theis, M., Mas, C., Doring, B., Degen, J., Brink, C., Caille, D., Charollais, A., Kruger, O., Plum, A., Nepote, V., *et al.* (2004). Replacement by a lacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp Cell Res* 294, 18-29.

Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.

Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L., and Melton, D.W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56, 313-321.

Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C., and Calos, M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244, 47-54.

Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S., and Calos, M.P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* 21, 3926-3934.

Torres, M. (1998). The use of embryonic stem cells for the genetic manipulation of the mouse. *Curr Top Dev Biol* 36, 99-114.

Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I., and Kellendonk, C. (2002). When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* 529, 116-121.

Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., and Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-1326.

Tsuneoka, M., and Mekada, E. (1992). Degradation of a nuclear-localized protein in mammalian COS cells, using *Escherichia coli* beta-galactosidase as a model protein. *The Journal of biological chemistry* 267, 9107-9111.

Turan, S., Kuehle, J., Schambach, A., Baum, C., and Bode, J. (2010). Multiplexing RMCE: versatile extensions of the Flp-recombinase-mediated cassette-exchange technology. *Journal of molecular biology* 402, 52-69.

Turan, S., Qiao, J., Madden, S., Benham, C., Kotz, M., Schambach, A., and Bode, J. (2014). Expanding Flp-RMCE options: the potential of Recombinase Mediated Twin-Site Targeting (RMTT). *Gene* 546, 135-144.

Tyagi, R.K., Lavrovsky, Y., Ahn, S.C., Song, C.S., Chatterjee, B., and Roy, A.K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14, 1162-1174.

Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T., and Mulligan, R.C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 65, 1153-1163.

Ueno, T., Matsumura, H., Tanaka, K., Iwasaki, T., Ueno, M., Fujinaga, K., Asada, K., and Kato, I. (2000). Site-specific integration of a transgene mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector using the Cre/loxP-expression-switching system. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 473-478.

Utomo, A.R., Nikitin, A.Y., and Lee, W.H. (1999). Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17, 1091-1096.

Vallier, L., Mancip, J., Markossian, S., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Metzger, D., Chambon, P., Samarut, J., and Savatier, P. (2001). An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2467-2472.

van de Putte, P., and Goosen, N. (1992). DNA inversions in phages and bacteria. *Trends Genet* 8, 457-462.

- Van den Plas, D., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., and Merregaert, J. (2003). Efficient removal of LoxP-flanked genes by electroporation of Cre-recombinase mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 10-15.
- van der Weyden, L., Adams, D.J., and Bradley, A. (2002). Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* 11, 133-164.
- Van Dyke, T., and Jacks, T. (2002). Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108, 135-144.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2, 13-28.
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8551-8556.
- Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schamel, W.W., and Reth, M. (1999). Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem* 380, 1435-1438.
- Vooijs, M., Jonkers, J., and Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2, 292-297.
- Vooijs, M., van der Valk, M., te Riele, H., and Berns, A. (1998). FLP-mediated tissue-specific inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor gene in the mouse. *Oncogene* 17, 1-12.
- Voziyanov, Y., Konieczka, J.H., Stewart, A.F., and Jayaram, M. (2003). Stepwise manipulation of DNA specificity in FLP recombinase: progressively adapting FLP to individual and combinatorial mutations in its target site. *Journal of molecular biology* 326, 65-76.
- Voziyanova, E., Malchin, N., Anderson, R.P., Yagil, E., Kolot, M., and Voziyanov, Y. (2013). Efficient FLP-Int HK022 dual RMCE in mammalian cells. *Nucleic acids research* 41, e125.
- Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., Kanegae, Y., Saito, I., Hayashi, Y., Koike, M., and Kohara, M. (1998). Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *The Journal of biological chemistry* 273, 9001-9006.
- Wallen, M.C., Gaj, T., and Barbas, C.F., 3rd (2015). Redesigning Recombinase Specificity for Safe Harbor Sites in the Human Genome. *PloS one* 10, e0139123.
- Wang, Y., Krushel, L.A., and Edelman, G.M. (1996). Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3932-3936.
- Wang, Y., Yau, Y.Y., Perkins-Balding, D., and Thomson, J.G. (2011). Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant cell reports* 30, 267-285.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Weber, P., Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 14, 1777-1783.
- Wildin, R.S., Garvin, A.M., Pawar, S., Lewis, D.B., Abraham, K.M., Forbush, K.A., Ziegler, S.F., Allen, J.M., and Perlmutter, R.M. (1991). Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* 173, 383-393.
- Wilkie, T.M., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1986). Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Developmental biology* 118, 9-18.
- Will, E., Klump, H., Heffner, N., Schwieger, M., Schiedlmeier, B., Ostertag, W., Baum, C., and Stocking, C. (2002). Unmodified Cre recombinase crosses the membrane. *Nucleic acids research* 30, e59.

- Williams, R.S., and Wagner, P.D. (2000). Transgenic animals in integrative biology: approaches and interpretations of outcome. *J Appl Physiol* 88, 1119-1126.
- Wolf, E., Schernthaler, W., Zakhartchenko, V., Prelle, K., Stojkovic, M., and Brem, G. (2000). Transgenic technology in farm animals—progress and perspectives. *Exp Physiol* 85, 615-625.
- Wunderlich, F.T., Wildner, H., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2001). New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic acids research* 29, E47.
- Wylie, A.A., Pulford, D.J., McVie-Wylie, A.J., Waterland, R.A., Evans, H.K., Chen, Y.T., Nolan, C.M., Orton, T.C., and Jirtle, R.L. (2003). Tissue-specific inactivation of murine M6P/IGF2R. *The American journal of pathology* 162, 321-328.
- Xu, X., Li, C., Garrett-Beal, L., Larson, D., Wynshaw-Boris, A., and Deng, C.X. (2001). Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis* 30, 1-6.
- Yamamoto, M., Shook, N.A., Kanisicak, O., Yamamoto, S., Wosczyzna, M.N., Camp, J.R., and Goldhamer, D.J. (2009). A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis* 47, 107-114.
- Yamauchi, Y., Abe, K., Mantani, A., Hitoshi, Y., Suzuki, M., Osuzu, F., Kuratani, S., and Yamamura, K. (1999). A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Developmental biology* 212, 191-203.
- Yang, H., Wang, H., Czura, C.J., and Tracey, K.J. (2005). The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 78, 1-8.
- Yang, S., Delgado, R., King, S.R., Woffendin, C., Barker, C.S., Yang, Z.Y., Xu, L., Nolan, G.P., and Nabel, G.J. (1999). Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther* 10, 123-132.
- Yarranton, G.T. (1992). Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3, 506-511.
- Young, N.P., Crowley, D., and Jacks, T. (2011). Uncoupling cancer mutations reveals critical timing of p53 loss in sarcomagenesis. *Cancer research* 71, 4040-4047.
- Yu, Y., and Bradley, A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2, 780-790.
- Yu, Y., Tong, Q., Li, Z., Tian, J., Wang, Y., Su, F., Wang, Y., Liu, J., and Zhang, Y. (2014). Improved site-specific recombinase-based method to produce selectable marker- and vector-backbone-free transgenic cells. *Scientific reports* 4, 4240.
- Yu, Y., Wang, Y., Tong, Q., Liu, X., Su, F., Quan, F., Guo, Z., and Zhang, Y. (2013). A site-specific recombinase-based method to produce antibiotic selectable marker free transgenic cattle. *PloS one* 8, e62457.
- Yui, M.A., and Rothenberg, E.V. (2014). Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol* 14, 529-545.
- Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F., and Bianchi, M.E. (1996). HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J* 15, 4981-4991.
- Zhang, J., Zhao, J., Jiang, W.J., Shan, X.W., Yang, X.M., and Gao, J.G. (2012). Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *Journal of Zhejiang University Science B* 13, 511-524.
- Zhang, M., and Kirsch, D.G. (2015). The generation and characterization of novel Col1a1FRT-Cre-ER-T2-FRT and Col1a1FRT-STOP-FRT-Cre-ER-T2 mice for sequential mutagenesis. *Disease models & mechanisms* 8, 1155-1166.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., and Reth, M. (1996). Inducible

site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic acids research* 24, 543-548.

Zhang, Z., and Lutz, B. (2002). Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic acids research* 30, e90.

Zheng, B., Zhang, Z., Black, C.M., de Crombrughe, B., and Denton, C.P. (2002). Ligand-dependent genetic recombination in fibroblasts : a potentially powerful technique for investigating gene function in fibrosis. *The American journal of pathology* 160, 1609-1617.

Zhou, J., Cheng, X., Lu, Y.X., Huang, C.F., and Yang, X. (2002a). A transgenic mouse that targets the expression of Cre recombinase in pancreatic tissue. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18, 286-290.

Zhou, Z., Wang, D., Wang, X.J., and Roop, D.R. (2002b). In utero activation of K5.CrePR1 induces gene deletion. *Genesis* 32, 191-192.

Zhou, Z.X., Lane, M.V., Kemppainen, J.A., French, F.S., and Wilson, E.M. (1995). Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 9, 208-218.

Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V., and Wilson, E.M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *The Journal of biological chemistry* 269, 13115-13123.

Zoppi, S., Wilson, C.M., Harbison, M.D., Griffin, J.E., Wilson, J.D., McPhaul, M.J., and Marcelli, M. (1993). Complete testicular feminization caused by an amino-terminal truncation of the androgen receptor with downstream initiation. *J Clin Invest* 91, 1105-1112.

Zuris, J.A., Thompson, D.B., Shu, Y., Guilingier, J.P., Bessen, J.L., Hu, J.H., Maeder, M.L., Joung, J.K., Chen, Z.Y., and Liu, D.R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 33, 73-80.

ANEXO

New Insights into Host Factor Requirements for Prokaryotic β -Recombinase-mediated Reactions in Mammalian Cells*

Received for publication, December 27, 2000
Published, JBC Papers in Press, January 30, 2001, DOI 10.1074/jbc.M011725200

Vicente Díaz‡, Pilar Servet‡, Ignacio Prieto‡, Manuel A. Gonzalez‡, Carlos Martínez-A.‡, Juan C. Alonso§, and Antonio Bernad‡¶

From the ‡Departamento de Inmunología y Oncología and §Biología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

The prokaryotic β -recombinase catalyzes site-specific recombination between two directly oriented minimal *six* sites in mammalian cells, both on episomic and chromatin-integrated substrates. Using a specific recombination activated gene expression system, we report the site-specific recombination activity of an enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused version of β -recombinase (β -EGFP). This allows expression of active β -recombinase detectable *in vivo* and in fixed cells by fluorescence microscopy. In addition, cellular viability is compatible with a substantial level of expression of the β -EGFP protein. Using fluorescence-activated cell sorting, we have been able to enrich cell populations expressing this fusion protein. Application of this strategy has allowed us to study in more depth the host factor requirements for this system. Previous work showed that eukaryotic HMG1 protein was necessary and sufficient to help β -recombinase activity *in vitro*. The influence of ectopic expression of HMG1 protein in the recombination process has been analyzed, indicating that HMG1 overexpression does not lead to a significant increase on the efficiency of β -recombinase-mediated recombination both on episomal substrates and chromatin-associated targets. In addition, β -recombinase-mediated recombination has been demonstrated in HMG1 deficient cells at the same levels as in wild type cells. These data demonstrate the existence of cellular factors different from HMG-1 that can act as helpers for β -recombinase activity in the eukaryotic environment.

Site-specific recombinases have become a routine tool for conditional gene modifications, as an alternative to classical gene targeting technologies (1–3). These systems, which allow programmed intermolecular recombination, overcome some of the limitations of the classical knock-out systems, such as embryonic lethality or generation of compensation mechanisms. Cre-*loxP* is currently the system of choice, because of its

ability to induce targeted changes in model animals (1, 4). Using this system, tissue-specific, conditional, and inducible gene targeting events in a wide variety of tissues and organs have been reported (5–8). Although the utility of these systems is unquestionable, to date only the Cre-*loxP*, and to a lesser extent, the Flp/FRT systems are currently under use. Only very recently, the Int/attP site-specific recombination system from λ phage has proven to work successfully in plants (9). Moreover, there are relatively few reports on the combined use of these systems (10). It thus becomes important to study and characterize other site-specific recombination systems (SSR)¹ that could be used as an alternative to or in combination with existing ones.

β -Recombinase from the Gram-positive plasmid pSM19035 induces specific intramolecular recombination in mammalian cells, both in episomal plasmids and in chromatin-associated substrate structures (11). Plasmid pSM19035 has an unusual structure, because almost 80% of the molecule consists of a repeated sequence and two replication origins (12). Because replication of this plasmid follows the classical theta model, a mechanism must exist to ensure its complete replication (inversion) and maximization of plasmid segregation (resolution). The development of an *in vitro* recombination system based on the use of purified β -recombinase demonstrated both inversion and deletion activities associated to the protein (13), delimited the sequences required for directing the SSR reactions (13, 14), and characterized the requirements for both reactions (13). Unlike Cre and Flp, which belong to the Int recombinase family, β -recombinase is included in the family of resolvases/invertases and has the interesting property of catalyzing exclusively intramolecular recombination events (13, 15). At difference from Cre and Flp site-specific recombinases, which do not require additional factors (reviewed in Refs. 16 and 17), β -recombinase requires for deletions a supercoiled substrate and a chromatin-associated protein (*e.g.* bacterial Hbsu or eukaryotic HMG1 proteins) (14, 15, 18). We showed previously that the mammalian cell environment can provide such a host factor and that nuclear genomic DNA supercoiling is suitable for β -recombinase function (11).

To obtain additional insights regarding β -recombinase system application for the manipulation of eukaryotic genomes, we have developed a recombination-activated gene expression (RAGE) system dependent on β -recombinase activity that consists of the *lacZ* reporter gene separated from the promoter by

*This work was partially supported by Grants 07/057/96 and 08.6/0021/1997 from the Consejería de Cultura de la Comunidad Autónoma de Madrid, Grant SAF98-0008-CO4-O3 del Plan Nacional de Salud y Farmacia, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, and Grant BIO4-CT95-0274 from the Biotechnology Program, EU (to A. B.), and Grant PB96-0817 from Dirección General de Investigación, Ciencia y Tecnología, Grants 2FD97-1692-CO2-02 and 08.3/0028/98 from Consejería de Cultura de la Comunidad Autónoma de Madrid (to J. C. A.). The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Research Council (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and the Pharmacia Corporation. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-585-4562; Fax: 34-91-372-0493; E-mail: abernad@cnb.uam.es.

¹The abbreviations used are: SSR, site-specific recombination; RAGE, recombination-activated gene expression; GFP, green fluorescent protein; EGFP, enhanced green fluorescent protein; wt, wild type; KO, knock-out; FACS, fluorescence-activated cell sorting; bp, base pair(s); PCR, polymerase chain reaction; β -Gal, β -galactosidase; kb, kilobase(s); MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.

Inducible model for β -six-mediated site-specific recombination in mammalian cells

Pilar Servert, Javier Garcia-Castro, Vicente Díaz, Daniel Lucas, Manuel A. Gonzalez, Carlos Martínez-A and Antonio Bernad*

Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

Received September 4, 2005; Revised and Accepted December 1, 2005

ABSTRACT

The prokaryotic β recombinase catalyzes site-specific recombination between two directly oriented minimal six sites in chromatin-integrated substrates. Here, we demonstrate that an enhanced green fluorescent protein (EGFP)-fused version of β recombinase (β -EGFP) is fully active, retaining most specific activity. It is used to develop a recombination-dependent activatable gene expression (RAGE) system based on the androgen receptor (AR) ligand-binding domain (LBD). Two hybrid molecules, a direct fusion of the LBD-AR to the C-terminus of β recombinase (β -AR) and a triple fusion of β -EGFP to the same ligand-binding domain (β -EGFP-AR), were engineered and their subcellular behavior, stability and catalytic activity were evaluated. Both chimeric β recombinase proteins showed *in vivo* inducible recombinogenic activity dependent on addition of an androgen receptor agonist, although the β -AR fusion protein demonstrated more accurate ligand-dependent translocation from cytoplasm to nucleus.

INTRODUCTION

Site-specific recombinases have become a standard tool for conditional gene modifications, as an alternative to classical gene targeting technologies (1–3). These systems allow programmed inter- and intramolecular recombination that overcome some limitations of classical knockout systems, such as embryonic lethality or generation of compensation mechanisms. Cre-*loxP* and FLP-FRT are currently the systems of choice, due to their ability to induce targeted changes in

animal models and in plants (4). Using these systems, tissue-specific, conditional and inducible gene targeting events have been reported in a wide variety of tissues and organs (5–8); in addition, the Int-attP site-specific recombination (SSR) system from lambda phage recently proved to be successful in plants (9). There are few reports on the combined use of these systems (10); it is thus necessary to characterize other SSR systems that could be used as an alternative to or in combination with existing models.

β Recombinase from the Gram-positive plasmid pSM19035 induces specific intramolecular recombination in mammalian cells, in both episomal plasmids and chromatin-associated substrate structures (11,12). Plasmid pSM19035 has an unusual structure, as almost 80% of the molecule consists of a repeated sequence and two replication origins (13). Since replication of this plasmid follows the classical *theta* model, a mechanism must exist to ensure its complete replication (inversion) and maximization of plasmid segregation (resolution). Development of an *in vitro* recombination system based on purified β recombinase showed both inversion and deletion activities associated to the protein, delimited the sequences required for directing the SSR reactions and characterized the requirements for both reactions (13,14). Unlike Cre and FLP, which belong to the Int recombinase family, β recombinase is included in the resolvase/invertase family and catalyzes exclusively intramolecular recombination events (14–16). At difference from Cre and FLP SSR, which do not require additional factors [reviewed in 17,18], for deletion, β recombinase requires a supercoiled substrate and a chromatin-associated protein (e.g. bacterial Hbsu or eukaryotic HMG1 proteins) (16). The mammalian cell environment can provide such a host factor (12), and nuclear genomic DNA supercoiling seems to be sufficient for β recombinase function (11). The β recombinase-dependent SSR that uses the minimal defined recognition sequences (six) was denominated β -six (12). Owing to its specific characteristics, particularly to its

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 585 4562; Fax: +34 91 372 0493; Email: abernad@cnb.uam.es

Present addresses:

Javier Garcia-Castro, Unidad de Oncología y Trasplante, Hospital Universitario del Niño Jesús, Avda. Menéndez Pelayo 65, E-28009 Madrid, Spain

Vicente Díaz and Manuel A. Gonzalez, Genetrix SL, Marconi 1, Parque Tecnológico de Madrid, Tres Cantos E-28760 Madrid, Spain

© The Author 2006. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org

In vivo site-specific recombination using the β -rec/*six* system

Pilar Servert¹, Vicente Díaz¹, Daniel Lucas¹, Teresa de la Cueva¹, Maria C. Rodriguez¹, Javier García-Castro¹, Juan C. Alonso², Carlos Martínez-A¹, Manuel A. González^{1,3}, and Antonio Bernad^{1,3}

BioTechniques 45:69-78 (July 2008)
doi 10.2144/000112826

*The prokaryotic β serine recombinase (β -rec) catalyzes site-specific recombination between two directly oriented six sites (93 bp) in mammalian cells, both in episomal and in chromosomally integrated substrates. The β -rec/*six* exclusive intramolecular site-specific recombination (SSR) system has been proposed as a suitable approach when several independently controlled recombination events are needed in a single cell. Here we explored the use of the β -rec/*six* system for selective induction of genome-targeted modifications. We generated and analyzed mouse transgenic lines (Tg β) expressing β -rec under the control of the Lck promoter. β -rec activity was demonstrated, and there was no evidence of alterations to thymic or peripheral T cell development. We developed two transgenic mouse lines harboring different target sequences (Tgrec and KO*six*) and analyzed the effect of β -rec expression on these animals. The results indicate that the β -rec/*six* SSR system is functional for in vivo gene-targeting applications.*

INTRODUCTION

Site-specific recombinases are the most important tool for conditional gene targeting (1–3). Commonly used enzymes that catalyze site-specific recombination (SSR) fall into two categories, based on evolutionary and mechanistic relatedness: the tyrosine recombinases and the serine recombinases (reviewed in Reference 4). Tyrosine recombinases (e.g., λ -Int, Cre, Flp) can catalyze integration and/or excision (4). Serine recombinases are subdivided into the small serine recombinases, which catalyze only intramolecular strand exchange (excision and/or inversion), and the large serine recombinases, which catalyze both inter- and intramolecular strand exchange (integration and excision) (5).

The small β serine recombinase (β -rec) from plasmid pSM19035 catalyzes SSR in mammalian cells, both in episomal plasmids and in chromosomally integrated substrate structures (6). To delete the target sequence, β -rec requires a supercoiled substrate and chromatin-associated protein (e.g.,

bacterial Hbsu or eukaryotic HMG1 proteins) (7,8), which can be provided by the mammalian cell environment (6). The β -rec SSR system that uses the *six* recognition sequence (9) is termed β -rec/*six* (10).

Current systems for conditional gene targeting (reviewed in Reference 11) allow spatio-temporal control of the genetic modification event, overcoming some limitations of classical targeting systems such as embryonic lethality or compensation mechanisms (12,13). Cre-*loxP* is the most widely used SSR system (1,14), and tissue-specific and conditional gene-targeting events are reported in a wide variety of tissues and organs (15–18). Although the utility of these systems is unquestionable, to date only Cre-*loxP* and, to a lesser extent, the Flp/*FRT* and Int/*attP* SSR systems (19–21) are used in vivo. The phage ϕ C31- and ϕ BT1-encoded large serine recombinases integrate expression constructs flanked by their respective specific recognition sites (*attB*) into genomic pseudo-*attP* sites (22); this model has been used for complete and persistent phenotypic correction in phenylketonuric mice

(21), the tyrosinemia type I mouse model (22), and keratinocytes from epidermolysis bullosa patients (21,22).

Controlled induction of SSR is clearly advantageous. Lineage-specific expression of the recombinase provides a first level of control. A second level is obtained by using an inducible promoter, or by fusing the recombinase to a protein module that retains it in the cytoplasm until interaction with inductor molecules translocates the fusion protein to the nucleus (23). The fusion method has been applied to the Cre-*loxP* and Flp-*FRT* systems, using the ligand binding domain (LBD) of the sex steroid nuclear receptors (11), and the androgen receptor LBD has recently been used in the β -rec/*six* model (24). The combined use of these systems remains limited (25,26), and therefore characterization of site-specific recombinases that could function as alternatives to or in combination with existing systems would be of interest.

We evaluated a β -rec-dependent recombination-activated gene expression (RAGE) system, consisting of the *lacZ* reporter gene separated by a *sixed* puromycin resistance gene

¹Departamento de Inmunología y Oncología, ²Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Spanish National Research Council (CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid, and ³Department of Regenerative Cardiology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain